

Untersuchung des Infektionsverhaltens verschiedener respiratorischer Viren in humanem *ex vivo* kultiviertem Lungengewebe

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Anne Becher (M.Sc.)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrick Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann

2. Prof. Dr. Stefan Hippenstiel

3. PD Dr. Thorsten Wolff

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2015

Zusammenfassung

Mechanismen, die zur unterschiedlichen Pathogenität niedrig- und hochpathogener aviärer und humanpathogener Influenzaviren im Menschen beitragen, sind bisher nur ansatzweise verstanden. Auch sind Pathomechanismen, die der Middle East Respiratory Syndrome (MERS)-CoV-Infektion zu Grunde liegen, bisher weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurde ein humanes *ex vivo* Lungenkulturmodell für die Untersuchung der Influenzavirus- und der MERS-CoV-Infektion etabliert. Dabei wurde die Replikationsfähigkeit und der Zelltropismus der Viren systematisch verglichen. Während hochpathogene aviäre, saisonale und pandemische Influenzaviren effizient in der humanen Lunge replizierten, konnten sich niedrigpathogene aviäre Viren und ein porcines Virus kaum vermehren. Alle Viren zeigten jedoch den gleichen Zelltropismus und infizierten im Alveolarepithel ausschließlich Typ II Zellen. Die unterschiedliche Pathogenität dieser Viren lässt sich daher nicht durch Unterschiede im Zelltropismus erklären. Gleichwohl konnte der humane und der aviäre Influenzavirusrezeptor sowohl auf Typ II als auch auf Typ I Zellen nachgewiesen werden. Niedrigpathogene aviäre Influenzaviren sind in der humanen Lunge durch die Freisetzung von zum größten Teil nicht infektiösen Viruspartikeln restringiert.

MERS-CoV replizierte in humanem Lungengewebe mit ähnlicher Kinetik wie ein hochpathogenes H5N1 Virus. MERS-CoV Antigen war sowohl im Bronchialepithel, Alveolarepithel sowie im Endothel nachweisbar. Der funktionelle Rezeptor des MERS-CoV, die Dipeptidylpeptidase 4, wurde in allen infizierten Zelltypen sowie in Alveolarmakrophagen nachgewiesen. Die mikroskopische Analyse infizierter Gewebeproben weist zudem auf einen infektionsbedingten Alveolarschaden hin.

Die Studie trägt wesentlich zum pathophysiologischen Verständnis pulmonaler Influenzavirus- und MERS-CoV-Infektionen bei. Das humane *ex vivo* Lungenkulturmodell stellt ein klinisch relevantes Modell zur Untersuchung respiratorischer Infektionen im Menschen dar.

Abstract

Mechanisms contributing to the different pathogenicity of low and highly pathogenic avian and seasonal influenza viruses in humans are currently only partially understood. Furthermore, underlying pathological mechanisms of the Middle East Respiratory Syndrome (MERS)-CoV infection in humans are widely unknown.

In this study a human *ex vivo* lung culture model was established, which allowed investigating influenza virus and MERS-CoV infection. Replication and cellular tropism of the different viruses were compared systematically. While highly pathogenic avian, seasonal and pandemic influenza viruses replicated efficiently, low pathogenic avian viruses and a porcine virus propagated poorly. However, all viruses showed the same cellular tropism and infected only type II cells within the alveolar epithelium. Therefore, the different pathogenicity of these viruses cannot be attributed to different cellular tropisms. Nevertheless, the human and the avian influenza virus receptor could be detected on type II and type I cells. Low pathogenic avian influenza viruses are restricted in the human lung by the release of mostly non-infectious progeny virus particles.

The MERS-CoV replicated with similar kinetics to a highly pathogenic H5N1 virus in the human lung. MERS-CoV antigen was detected in the bronchial epithelium, alveolar epithelium and endothelium. The functional receptor of MERS-CoV, dipeptidylpeptidase 4, was found in all infected cell types and in alveolar macrophages. Microscopic analysis of infected tissue samples indicated an alveolar damage provoked by MERS-CoV infection.

This study contributes substantially to the pathophysiological understanding of the pulmonary influenza virus and MERS-CoV infection. The human *ex vivo* lung culture model represents a clinically relevant model to investigate human respiratory infections.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen	VII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Ambulant erworbene Pneumonie (Community Aquired Pneumonia – CAP)	1
1.2 Influenza A Viren	1
1.2.1 Klassifizierung und Taxonomie	1
1.2.2 Morphologie und Struktur der Virionen	2
1.2.3 Genomorganisation.....	3
1.2.4 Replikationszyklus	4
1.2.5 Pathogenese und Epidemiologie.....	7
1.2.5.1 Saisonale Influenza A Viren	9
1.2.5.2 Hochpathogene aviäre Influenza (HPAI) A Viren	9
1.2.5.3 Pandemisches A(H1N1) 2009 Virus.....	12
1.2.5.4 Neues Influenzavirus A (H7N9)	13
1.2.6 Wirtsspezifität und Speziesbarriere	13
1.3 Coronaviren.....	15
1.3.1 Morphologie und Aufbau	15
1.3.2 Replikationszyklus	16
1.3.3 Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)	18
1.4 Der menschliche Respirationstrakt	20
1.5 Akutes Atemnotsyndrom (ARDS) in der viralen Pneumonie	23
1.6 Zielsetzung.....	24
2 Materialien und Methoden	26
2.1 Materialien	26
2.1.1 Geräte.....	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3 Chemikalien	27

2.1.4	Pufferund Lösungen.....	28
2.1.5	Medien und Zusätze	28
2.1.6	Enzyme.....	30
2.1.7	Antikörper, Seren und Lektine.....	30
2.1.8	Reaktionssysteme und Kits.....	31
2.1.9	Primer	32
2.1.10	Plasmide.....	32
2.1.11	Stimulanzien und Inhibitoren	33
2.1.12	Virusstämme.....	33
2.1.13	humane Lungengewebeproben.....	34
2.1.14	Zytospins einer brochoalveoläre Lavage (BAL) eines MERS-CoV- infizierten Patienten	34
2.1.15	Zelllinien.....	35
2.1.15.1	MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)-Zelllinie.....	35
2.1.15.2	A549 Zelllinie	35
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Zellbiologische Methoden	35
2.2.1.1	Auftauen von Zellen	35
2.2.1.2	Anlegen von Cryostocks	36
2.2.1.3	Kultivieren und Passagieren von A549 Zellen	36
2.2.1.4	Stimulation von A549 Zellen.....	36
2.2.1.5	Kultivierung und Passagieren von MDCK Zellen.....	37
2.2.1.6	Zellzahlbestimmung.....	37
2.2.1.7	Vorbereitung humaner Lungengewebeproben.....	37
2.2.1.8	Stimulation humaner Lungengewebeproben	38
2.2.2	Immunhistochemie und Lektinhistochemie.....	39
2.2.2.1	Probengewinnung	39
2.2.2.2	Fluoreszenzmarkierung des Influenza A Antikörpers.....	39
2.2.2.3	Durchführung der Immunhistochemie.....	40
2.2.2.4	Durchführung der Lektinhistochemie.....	42
2.2.2.5	Immunfärbung von Zytospins (BAL)	44
2.2.2.6	Mikroskopische Auswertung.....	44
2.2.2.7	Mikroskopische Auswertung.....	44
2.2.2.7.1	Spektrales Entmischen	45
2.2.2.7.2	Dreisimensionale Bildstapel und Maximumintensitätsprojektionen.....	46

2.2.2.7.3	Live-Cell-Imaging PR8 NS1-GFP (H1N1) infizierter Gewebeproben.....	46
2.2.2.8	Digitale Bildanalyse immunhistologischer Präparate	46
2.2.3	Virologische Methoden	47
2.2.3.1	Anlegen von Virusstocks	47
2.2.3.2	Plaque-Titrations-Assay.....	47
2.2.3.3	Hämagglutinationstest	48
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	49
2.2.4.1	RNA Isolation	49
2.2.4.2	Reverse Transkription	50
2.2.4.3	Quantitative Real-Time PCR	51
2.2.5	LDH-Assay	53
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Etablierung eines <i>ex vivo</i> Lungengewebekulturmodells	55
3.1.1	Struktureller Gewebeerhalt und Zytotoxizität über 72 h <i>ex vivo</i> Kultivierung	56
3.1.2	Apoptoserate über 72 h <i>ex vivo</i> Kultivierung.....	58
3.2	Infektionsverhalten aviärer, porciner und humanpathogener Influenza A Viren in humanem Lungengewebe	60
3.2.1	Replikation und immunhistologischer Nachweis von viralem Antigen	60
3.2.2	Vergleich der Anzahl infektiöser und physikalischer Partikel im Überstand nach Infektion von humanem Lungengewebe und A549 Zellen mit Pan/99 (H3N2) und Dk/Alb (H12N5)	63
3.2.3	Rezeptorbesatz.....	67
3.2.4	Zelltropismus	69
3.2.5	Zelltropismus des neuen Influenza A(H7N9) Virus.....	76
3.2.6	Infektion fibrotischer Lungen durch saisonales H3N2 Virus	77
3.2.7	Lebendgewebemikroskopie Influenzavirus-infizierter Alveolarepithelzellen.....	79
3.3	Infektionsverhalten des MERS Coronavirus in humanem Lungengewebe	80
3.3.1	Replikation und Antigennachweis im Gewebe.....	80
3.3.2	Zelltropismus	82
3.3.3	Rezeptorexpression.....	84
3.3.4	MERS-CoV induzierte Apoptose und alveolärer Schaden	86
4	Diskussion.....	89

4.1	Charakterisierung von <i>ex vivo</i> kultiviertem Lungengewebe	89
4.2	Replikationsverhalten saisonaler, pandemischer, aviärer und porciner Influenzaviren	90
4.3	Rezeptorexpression und -verteilung im unteren Respirationstrakt.....	91
4.4	Zelltropismus saisonaler, pandemischer, aviärer und porciner Influenzaviren	93
4.5	Zelltropismus des neuen H7N9 Influenzavirus	100
4.6	Pulmonale Fibrose als Risikofaktor für schwere Verläufe der Influenzavirusinfektion	101
4.7	Alveolärer Schaden nach Influenzavirusinfektion	102
4.8	Restriktion niedrig pathogener aviärer Viren in der humanen Lunge durch Produktion von hauptsächlich nicht-infektiösen Nachkommenviren	104
4.9	Infektionsverhalten von MERS-CoV in humanem Lungengewebe.....	108
4.10	Humanes <i>ex vivo</i> kultiviertes Lungengewebe als Infektionsmodell.....	111
	Literaturverzeichnis.....	118
	Anhang	135
	Publikationen.....	138
	Danksagung	140

Abkürzungen

ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2
AE	Alveolarepithel
ALI	akutes Lungenversagen (Acute Lung Injury)
AM	Alveolarmakrophagen
AP	alkalische Phosphatase
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom des Erwachsenen (Acute Respiratory Distress Syndrome)
BAL	Bronchioalveolären Lavage
BE	Bronchialepithel
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
CAP	Community Aquired Pneumonia
CD68	Cluster of Differentiation 68
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
CPE	zytopatischer Effekt (Cytopathic Effect)
cRNA	komplementäre RNA
Ct	Cycle Threshold
DAD	Diffuser Alveolarschaden (Diffuse Alveolar Damage)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethyl
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DKG	Dampfkochgarer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
DR	Death Receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELMOD2	ELMO Domain Containing 2
EMP2	Epithelial Membrane Proteine 2
ER	endoplasmatischen Retikulum
FasL	Fas Ligand
FCS	fetales Kälberserum (Foetal Bovine Serum)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HAP	hämagglutinierender Partikel (Haemagglutinating Particle)
HAU	hämagglutinierende Einheit (Haemagglutinating Unit)

Abkürzungen

HCoV	humanes Coronavirus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPAI	hochpathogene aviäre Influenza
IFN	Inteferon
LDH	Laktatdehydrogenase
LPAI	niedrigpathogene aviäre Influenza
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MAA	Maackia Amurensis Lectin/ Agglutinin
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MERS-CoV	Middle East Respiratory Distress Syndrome Coronavirus
Min	Minute
ml	Milliliter
MOI	Multiplicity Of Infection
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NA	Neuraminidase
NCR	nicht kodierende Sequenz (Non-coding Region)
NEP	nukleäres Exportprotein
NLS	Kernlokalisationssequenzen
NP	Nukleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NS2	Nichtstrukturprotein 2
NTP	Nukleosidtriphosphat
PA	saures Polymersaeprotein
PB1	basisches Polymeraseprotein 1
PB2	basisches Polymeraseprotein 2
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCLD	Precision Cut Lung Slices
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Plaque Forming Unit
PKR	Proteinkinase R
proSP-C	Prosurfactant Protein C
PVA	Pattern of Viral Attachment
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RBD	Rezeptorbindedomäne

Abkürzungen

rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (Revolutions Per Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT PCR	Real Time Polymerasekettenreaktion
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinasen
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
Sek	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes (Standard Error of the Mean)
SNA	Sambucus Nigra Lectin/ Agglutinin
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TPCK	N-(p-Toluenesulfonyl)-L-phenylalanyl Chloromethyl Ketone
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
vRNA	virale RNA
vRNP	virales Ribonukleoprotein
WHO	World Health Organization
μ l	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie und Aufbau eines Influenzaviruspartikels.....	3
Abbildung 2: Schema der Influenza A Virus RNA Synthese.....	5
Abbildung 3: Replikationszyklus der Influenzaviren.	6
Abbildung 4: Evolution der pandemischen Influenzaviren.	8
Abbildung 5: Humaner (SA α 2-6Gal) und aviärer Influenzavirus Rezeptor (SA α 2-3Gal).	15
Abbildung 6: Aufbau von Coronaviren.	16
Abbildung 7: Replikationszyklus von Coronaviren:	18
Abbildung 8: Aufzweigungen und Epithelien der unteren Atemwege des Menschen.	21
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Lungengewebepräparation für die <i>ex vivo</i> Kultivierung und Infektion.....	56
Abbildung 10: HE Übersichtsfärbungen über 72 h <i>ex vivo</i> kultivierter Lungengewebeproben.	57
Abbildung 11: Zytotoxizität in <i>ex vivo</i> kultivierten Lungengewebeproben über 72 h.	58
Abbildung 12: Anzahl apoptotischer Zellen in <i>ex vivo</i> kultivierten Lungengewebeproben über 72h.	59
Abbildung 13: Replikation und immunhistologischer Nachweis von viralem Antigen in <i>ex vivo</i> infizierten Lungengewebe.	61
Abbildung 14: Vergleich der Zahl infektiöser Partikel im Überstand und Anzahl Influenza A Antigen-positiver Zellen im Gewebe 24 h p.i.	62
Abbildung 15: Vergleich der Anzahl von infektiösen und physikalischen Partikeln im Lungenkulturüberstand nach Infektion mit Pan/99 (H3N2) und Dk/Alb (H12N5).....	64
Abbildung 16: Vergleich der Anzahl von infektiösen und physikalischen Partikeln im Zellkulturüberstand nach Infektion von A549-Zellen mit Pan/99 (H3N2) und Dk/Alb (H12N5).	66
Abbildung 17: Nachweis des humanen (SA α 2-6Gal) und aviären (SA α 2-3Gal) Influenzavirusrezeptors in humanem Lungengewebe.	67
Abbildung 18: Immunhistologischer Nachweis des humanen (SA α 2-6Gal) und des aviären (SA α 2-3Gal) Influenzavirusrezeptors auf Typ I und Typ II Zellen.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen im Bronchialepithel 24h nach Infektion der Lungengewebeproben mit dem entsprechenden Virus.	69
Abbildung 20: Keine Kolokalisation des Typ II Zellmarkers proSP-C und des Typ I Zellmarkers Caveolin 1 im Alveolarepithel.	70
Abbildung 21: Immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen in Typ II Zellen 24 h nach Infektion der Lungengewebeproben mit dem entsprechenden Virus.....	71
Abbildung 22: Kein immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen in Typ I Zellen 24 h nach Infektion der Lungengewebeproben.	72
Abbildung 23: Kein immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen in Typ I Zellen 24 h nach Infektion der Lungengewebeproben.	73
Abbildung 24: Immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen in Alveolarmakrophagen 24 h nach Infektion der Lungengewebeproben.	74
Abbildung 25: Quantifizierung Influenza A Virus infizierter Zellen.....	75
Abbildung 26: Zelltropismus des neuen Influenza A(H7N9) Virus und zweier aviärer Viren vom Subtyp H7N1 und H7N7 im Alveolarepithel.....	76
Abbildung 27: Typ II Zellproliferation in Lungengewebe von Patienten mit pulmonaler Fibrose.....	77
Abbildung 28: Infektion von humanem fibrotischen Lungengewebe durch saisonales H3N2 Virus.	78
Abbildung 29: Live-Cell-Imaging Influenzavirus-infizierter Typ II Zellen im Gewebeverband.....	79
Abbildung 30: Immunhistologischer Nachweis von MERS-CoV viralem Antigen in infizierten Gewebeproben mittels Patientenserum.	81
Abbildung 31: Vergleich der Replikationskurven und der Antigenverteilung im Alveolarepithel von MERS-CoV und Thai/04 (H5N1).	82
Abbildung 32: Immunhistologischer Nachweis von MERS-CoV-Antigen in Typ I und Typ II Zellen.....	83
Abbildung 33: Immunhistologischer Nachweis von MERS-CoV-Antigen in Bronchial- und Endothelzellen.	84
Abbildung 34: DPP4 Expression im unteren Respirationstrakt.....	85
Abbildung 35: DPP4-Expression auf Alveolarmakrophagen.	86

Abbildung 36: Apoptose und Ablösung MERS-CoV infizierter Alveolarepithelzellen aus dem Gewebeverband.....	87
Abbildung 37: Morphologische Kennzeichen der Apoptose in MERS-CoV-infizierten Zellen aus der BAL eines MERS-CoV-infizierten Patienten.....	88
Abbildung 38: Modell der Replikation humanpathogener und niedrigpathogener aviärer Influenzaviren in der Alveole.....	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: virale Genomsegmente und die entsprechenden kodierten Proteine	4
Tabelle 2: Geräte.....	26
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 4: Chemikalien	27
Tabelle 5: Puffer und Lösungen	28
Tabelle 6: Medien und Zusätze für MDCK Zellen.....	28
Tabelle 7: Medien und Zusätze für A549 Zellen	29
Tabelle 8: Medien und Zusätze für die Kultivierung von humanem Lungengewebe	30
Tabelle 9: Enzyme	30
Tabelle 10: Primärantikörper, Seren und Lektine	30
Tabelle 11: Sekundärantikörper.....	31
Tabelle 12: Reaktionssysteme und Kits.....	31
Tabelle 13: Primer - Real-Time PCR	32
Tabelle 14: Primer - Reverse Transkription.....	32
Tabelle 15: Plasmide	32
Tabelle 16: Stimulanzen und Inhibitoren.....	33
Tabelle 17: Virusstämme	33
Tabelle 18: Automatische Paraffineinbettung der Gewebeproben	39
Tabelle 19: Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte.....	40
Tabelle 20: Epitopdemaskierung	41
Tabelle 21: eingesetzte Primärantikörpervedünnungen.....	41
Tabelle 22: Hämalanfärbung und Entwässerung der Gewebeschnitte	42
Tabelle 23: Methylgrünfärbung und Entwässerung der Gewebeschnitte.....	43
Tabelle 24: HC-RT Ansatz für Influenza A-spezifische RT	51
Tabelle 25: RT-Programm im Thermocycler	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 26: Real-Time PCR Ansatz	52
Tabelle 27: Real Time PCR Programm	52
Tabelle 28: Zusammenfassung publizierter Studien zur Influenza A Rezeptorexpression in der humanen Lunge	92
Tabelle 29: Zusammenfassung publizierter Studien zum Zelltropismus von Influenza A Viren in der humanen Lunge	96
Tabelle 30: Zusammenfassung publizierter Studien zum Zelltropismus von Influenza A Viren in der murinen Lunge.....	96

1 Einleitung

1.1 Ambulant erworbene Pneumonie (Community Aquired Pneumonia – CAP)

Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP) bezeichnet eine akute mikrobielle Infektion des Lungenparenchyms, deren auslösende Erreger nicht im Krankenhaus aufgenommen wurden. Sie ist weltweit mit einer hohen Morbidität und Mortalität verknüpft und verursacht jährlich hohe Kosten für die Gesundheitssysteme (Welte et al. 2012). Die häufigste Ursache der CAP ist eine bakterielle Infektion, wobei *Streptococcus pneumoniae* mit 23 – 44% der am häufigsten isolierte Erreger ist (Finch 2001; Welte et al. 2012; Irfan et al. 2013). Nach Bakterien sind Viren die zweithäufigsten Pneumonieerreger. So werden ungefähr ein Drittel der CAP-Fälle beim Erwachsenen durch Viren verursacht, wobei die Zahl der jährlich auftretenden viralen Pneumonien weltweit auf ca. 100 Millionen geschätzt wird (Ruuskanen et al. 2011). Vor allem Inflenzaviren, Respiratorische Synzytial-Viren, Rhinoviren, Adenoviren aber auch Coronaviren sind mit der CAP im Erwachsenen assoziiert (Ruuskanen et al. 2011; Cesario 2012). Abhängig vom Erreger, dem Alter, Immunstatus und eventuellen Vorerkrankungen des Patienten werden bei der viralen Pneumonie milde und selbst-limitierende bis hin zu schweren lebensbedrohlichen Verläufen beobachtet. Das Auftreten von H7N9- und hochpathogenen H5N1 Inflenzaviren im Menschen, die SARS (Severe Akute Respiratory Syndrome) -Coronavirus (CoV)-Pandemie 2002/2003, die H1N1-Pandemie 2009 sowie die seit 2012 beobachtete neu im Menschen auftretende Infektion mit dem Middle East Respiratory Distress Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) unterstreicht die Bedeutung respiratorischer Viren als Auslöser schwerer Pneumonien (To et al. 2001; Peiris et al. 2004; Gao et al. 2013; Gao et al. 2013; The Who Mers-Cov Research 2013).

1.2 Influenza A Viren

1.2.1 Klassifizierung und Taxonomie

Inflenzaviren gehören neben Thogo- und Isaviren zu der Familie der *Orthomyxoviridae*. Dabei handelt es sich um behüllte Viren mit einem einzelsträngigen segmentierten RNA Genom negativer Polarität. Inflenzaviren werden in die Typen A, B oder C eingeteilt. Die für den Menschen klinisch relevanten Typen A und B sind für die jährlich auftretenden Influenza-Epidemien verantwortlich (WHO 2014). Die Einteilung in Subtypen erfolgt anhand der beiden

Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Die Benennung der unterschiedlichen Influenzavirus-Isolate erfolgt nach einem international festgelegten Schema. Nach der Bezeichnung des Typs (A, B oder C) folgt die Nennung Spezies, aus welcher das Virus isoliert wurde. Im Falle des Menschen entfällt die Speziesangabe. Es folgen der Ort der Isolierung, die laufende Nummer des Isolats am Fundort, das Isolierungsjahr und im Fall von Influenza A Viren der Subtyp (Bsp.: A/Chicken/Guangdong/1/2005(H5N1)).

1.2.2 Morphologie und Struktur der Virionen

Influenza A Viren sind behüllte pleomorphe Viren mit filamentöser bis sphärischer Gestalt und einem Durchmesser von 80 bis 120 nm (Webster et al. 1978) (Abbildung 1A). In die Lipiddoppelschicht, welche die Hülle des Virions bildet und welche ursprünglich von der infizierten Zelle stammt (Kates et al. 1962), sind drei integrale viruskodierte Membranproteine eingelagert (Abbildung 1B). Besonders prominent sind das Hämagglutinin (HA), welches als Homotrimer vorliegt und die Neuraminidase (NA), ein Homotetramer. Diese Glykoproteine ragen als 10-14 nm lange *Spikes* weit über die Virusoberfläche hinaus. Das M2-Protein liegt ebenfalls als Homotetramer jedoch in geringerer Kopienzahl als HA und NA vor (Zebedee and Lamb 1988) und besitzt die Funktion eines Protonenkanals (Sugrue and Hay 1991; Pinto et al. 1992). Das Matrixprotein 1 (M1) ist mit der Innenseite der Lipidhülle assoziiert und kleidet diese aus. Es bildet eine Matrix, welche mit den viralen Ribonukleoprotein (vRNP)-Komplexen assoziiert. Die vRNPs bestehen aus den viralen RNA-Segmenten, welche jeweils über ihre gesamte Länge mit Nukleoprotein (NP)-Monomeren komplexiert sind (Compans et al. 1972) und damit 8 virale Ribonukleoprotein (vRNP)-Komplexe bilden. Die drei Untereinheiten des RNA-abhängigen RNA-Polymerase Komplexes, das basische Polymeraseprotein 1 (PB1) und 2 (PB2) sowie das saure Polymerase-Protein (PA) sind ebenfalls mit den vRNPs assoziiert. Sie sind als Heterotrimer mit dem 3'-Ende eines jeden RNA-Segmentes verbunden. Weiterhin liegt im Virion eine sehr geringe Kopienzahl des Nichtstrukturproteins 2/nukleären Exportproteins (NS2/NEP) vor, welches mit dem M1 Protein assoziiert ist (Yasuda et al. 1993). Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) ist nicht Bestandteil des Virions und wird nur in infizierten Zellen exprimiert.

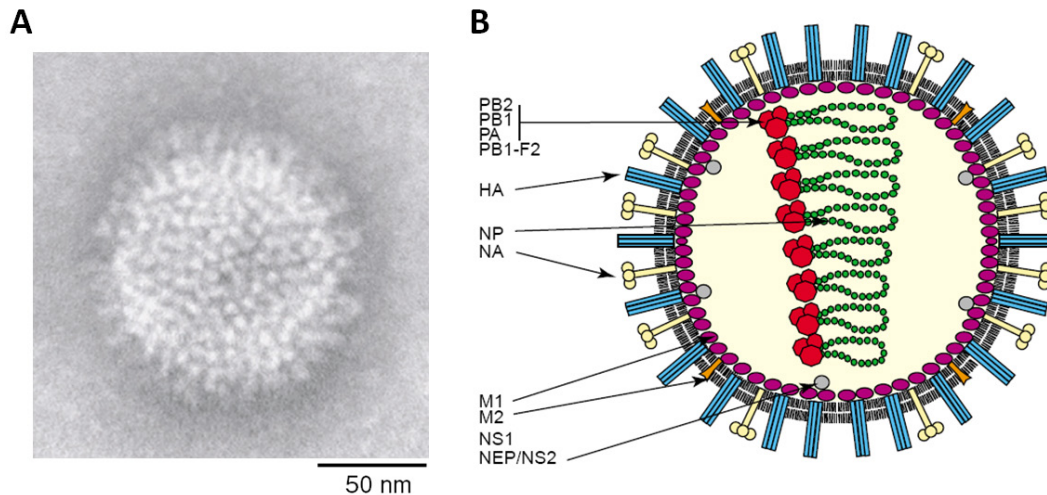


Abbildung 1: Morphologie und Aufbau eines Influenzaviruspartikels.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Influenza A-Virions (Whittaker 2001). **(B)** Schematische Darstellung eines Influenza A-Virions. Die Oberflächenproteine HA (Hämagglutinin), NA (Neuraminidase) und M2 (Matrixprotein 2) sind in die Virushülle eingelagert, welche im Inneren durch das M1 Protein (Matrixprotein 1) ausgekleidet wird. PB2 (basisches Polymeraseprotein 2), PB1 (basisches Polymeraseprotein 1), PA (saures Protein) und NP (Nukleoprotein) sind mit den viralen RNA-Segmenten assoziiert. NEP/NS2 (Nicht-Strukturprotein 2) ist ebenfalls Bestandteil des Viruspartikels, wohingegen NS1 (Nicht-Strukturprotein 1) nicht im Virion enthalten ist (Ludwig et al. 2003).

1.2.3 Genomorganisation

Das segmentierte Genom der Influenza A Viren umfasst insgesamt ca. 13600 Nukleotide. Die 8 unterschiedlich großen RNA-Segmente (Bean and Simpson 1976) kodieren für bis zu 11 virale Proteine und sind nach abnehmender Größe durchnummeriert (Tabelle 1). Die virale RNA hat eine negative Orientierung. Jedes RNA-Segment kodiert für 1 bzw. 2 Proteine. Die Segmente 1, 2, 3, 4, 5 und 6 kodieren jeweils für das PB2, PB1, PA, HA, NP und NA Protein. In einem alternativen +1 Leseraster kodiert das Segment 2 bei einigen Influenza A Viren zusätzlich für das Protein PB1-F2, ein kleines 87 Aminosäuren umfassendes Protein mit proapoptotischer Aktivität (Chen et al. 2001). Die Segmente 7 und 8 sind bicistronisch organisiert und kodieren für jeweils 2 Proteine: Segment 7 kodiert für die Matrixproteine M1 und M2 (Inglis and Brown 1981) und Segment 8 für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2/NEP (Inglis et al. 1980; Lamb and Lai 1980), wobei für die Translation der Proteine M2 und NS2/NEP die gespleißten mRNAs verwendet werden.

Die kodierenden Sequenzen aller vRNA-Segmente sind von nichtkodierenden Bereichen (*non-coding region* (NCR)) flankiert. Dazu gehören die ersten 12 Nukleotide am 3' Ende und die ersten 13 Nukleotide am 5' Ende, welche zwischen den verschiedenen Influenza A Virusstämmen hoch konserviert sind (Desselberger et al. 1980). Sie dienen als

Promotorstrukturen für die Transkription und die Replikation durch die virale RNA-abhängige RNA Polymerase (Fodor et al. 1994).

Tabelle 1: virale Genomsegmente und die entsprechenden kodierten Proteine

Segment	Zahl der Nukleotide	Protein	Funktion (u.a.)
1	2341	PB2 (basisches Protein 2)	Untereinheit der viralen Polymerase, 5'-Cap-Bindung zellulärer mRNAs
2	2341	PB1 (basisches Protein 1)	Untereinheit der viralen Polymerase, RNA-abhängige RNA-Polymerase
		PB1-F2	nicht in allen Isolaten exprimiert, alternativer Leserahmen (+1), akkumuliert in Mitochondrien, proapoptotisch
3	2233	PA (saures Protein)	Untereinheit der viralen Polymerase, Endonuklease
4	1778	HA (Hämagglutinin)	Oberflächenprotein, Rezeptorbindung und Membranfusion
5	1565	NP (Nucleoprotein)	komplexiert virale RNA
6	1413	NA (Neuraminidase)	Oberflächenprotein, Neuraminidase-Aktivität
7	1027	M1 (Matrixprotein1)	Interaktion mit HA, NA und vRNPs
		M2 (Matrixprotein2)	Oberflächenprotein, Ionenkanal
8	890	NS1 (Nicht-Strukturprotein 1)	Interferonantagonist
		NS2 (Nicht-Strukturprotein 2)	nukleärer Exportfaktor

1.2.4 Replikationszyklus

Nachdem das Virus mit Hilfe des Hämagglutinin (HA) an N-Acetyl-Neuraminsäuren auf der Oberfläche der Wirtszelle bindet (Weis et al. 1988), wird es durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen (Matlin et al. 1981) (Abbildung 3). Die zellulär gesteuerte Ansäuerung im späten Endosom führt zur Konformationsänderung des HA, wodurch die Fusion von Endosomen- und Virusmembran vermittelt wird (Skehel et al. 1982; Bullough et al. 1994). Voraussetzung dafür ist die vorausgegangene proteolytische Spaltung des HA₀-Vorläuferproteins in seine Untereinheiten HA₁ und HA₂ (Klenk et al. 1975; Lazarowitz and Choppin 1975). Der niedrige pH-Wert im Endosom führt außerdem zur Öffnung der M2 Protonenkanäle, wodurch Protonen in das Innere des Virus gelangen (Pinto et al. 1992). Durch die Ansäuerung im Virion kommt es zur Konformationsänderung der M1 Matrixproteine, welche sich daraufhin von den vRNPs lösen (Martin and Helenius 1991). Diese werden dann über Fusionsporen ins Zytoplasma freigesetzt (Helenius 1992). Alle am Aufbau der vRNPs beteiligten Proteine (NP, PB1, PB2 und PA) besitzen Kernlokalisationssequenzen (NLS) (Jones et al. 1986; Smith et al. 1987; Nath and Nayak 1990; Wang et al. 1997; Weber et al. 1998), wodurch sie durch zelluläre Importine erkannt und in den Kern transportiert werden (O'Neill et al. 1995; Melen et al. 2003). Hier erfolgt die

Replikation und Transkription des Virusgenoms (Abbildung 2). Die viralen RNA-Segmente negativer Orientierung [vRNA(-)] werden hier durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase zu einem in messenger RNA [mRNA(+)], welche in der frühen Infektionsphase als Vorlage zur Synthese der viralen Proteine dient und zum anderen die komplementäre RNA [cRNA(+)], welche erst nach Beginn der viralen Proteinsynthese gebildet wird, umgeschrieben (Bouvier and Palese 2008; Fodor 2013). Die [cRNA(+)] dient als Vorlage zur Synthese neuer genomischer vRNAs (Engelhardt and Fodor 2006).

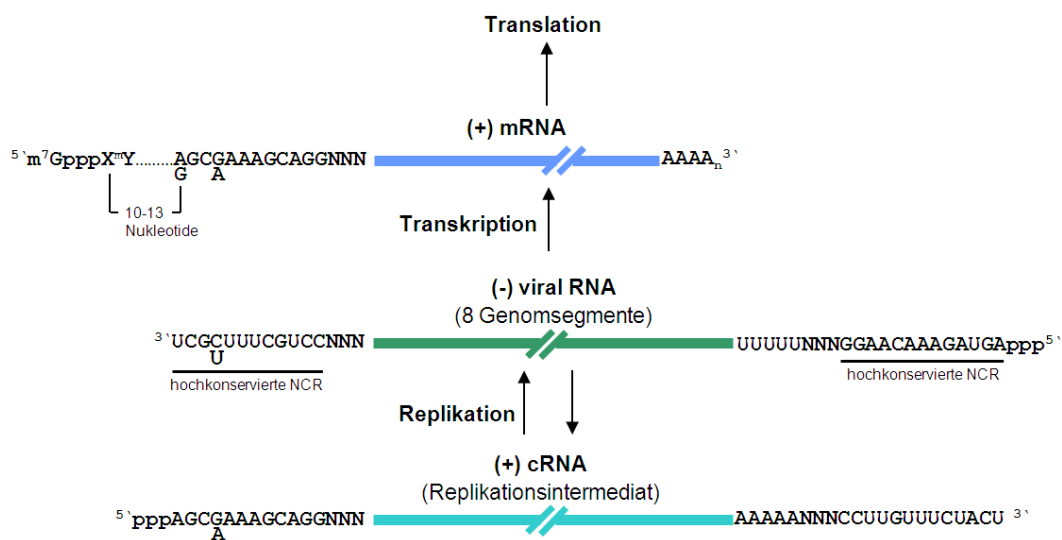


Abbildung 2: Schema der Influenza A Virus RNA Synthese.

Die virale RNA negativer Orientierung wird am 3'- und 5'-Ende von hochkonservierten nicht-kodierenden Sequenzen (NCR) flankiert, welche als virale Promotoren dienen und benachbart zu den segmentspezifischen Sequenzen (NNN) liegen. Die mRNA wird am 5'-Ende durch eine zelluläre Cap-Struktur und am 3'-Ende durch eine Poly-A-Sequenz flankiert. Die virale RNA wird in cRNA umgeschrieben und dient als Template für die Synthese neuer viraler RNAs. (modifiziert nach (Lamb and Choppin 1983))

Für die Initiation der Transkription viraler mRNA(+) werden die 5'-Cap-Strukturen der Wirtszell-mRNAs verwendet. Dieser Mechanismus wird auch als „Cap-Snatching“ bezeichnet (Dhar et al. 1980; Plotch et al. 1981; Neumann et al. 2004). Die neu synthetisierten viralen mRNAs werden anschließend durch virale und zelluläre Proteine über die Kernporen in das Zytoplasma exportiert (Schneider and Wolff 2009; Read and Digard 2010). Die Translation der viralen Membranproteine erfolgt an membrangebundenen Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) und die der restlichen Proteine an freien Ribosomen. Aufgrund ihrer Kernlokalisationssequenzen werden die Proteine PB2, PB1, PA, NP, M1 und NS1 in den Zellkern transportiert. Hier kommt es nun in der späteren Phase zur Replikation

des viralen Genoms. Die neu synthetisierten vRNAs(-) werden schon während ihrer Synthese vollständig mit Nukleoprotein verpackt (Neumann et al. 2004) und bilden dann mit den Untereinheiten der viralen Polymerase neue vRNPs, welche M1- und NEP/NS2-abhängig aus dem Zellkern transportiert werden (O'Neill et al. 1998; Bui et al. 2000; Neumann et al. 2000). Der Transport der Membranproteine HA, NA und M2 vom ER zur apikalen Zellmembran erfolgt über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Veit and Schmidt 1993; Barman et al. 2001; Nayak et al. 2004). Bei einer ausreichenden Menge an viralen Membranproteinen in der Zellmembran assemblieren dort vRNPs und M1. Die Membran stülpt sich aus, umschließt die vRNPs und das Virus wird über Knospung freigesetzt (Rossman and Lamb 2011). Die Neuraminidase entfernt endständige Neuraminsäuren von Glykolipiden und Membranglykoproteinen auf der Zelloberfläche und verhindert somit die Retention neugebildeter Viruspartikel auf der Oberfläche (Palese et al. 1974).

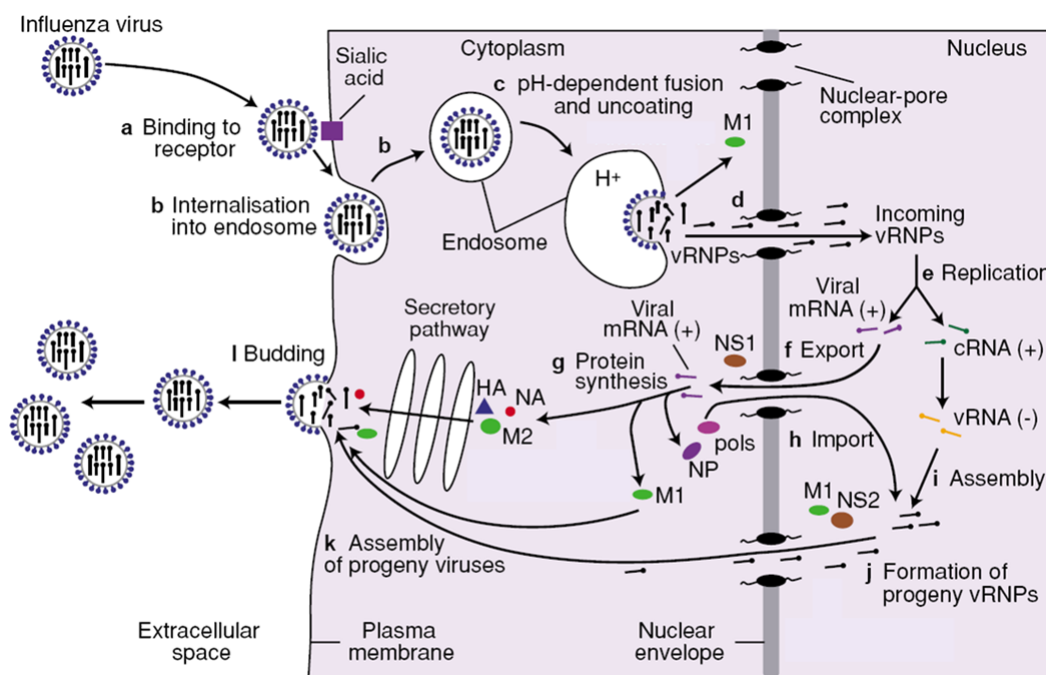


Abbildung 3: Replikationszyklus der Influenzaviren.

Das Virus bindet über seinen Rezeptor (a) an die Wirtszelle und wird über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (b). Nach pH-abhängiger Fusion von Virus- und Endosomenmembran erfolgt die Freisetzung der viralen Ribonukleoproteine (vRNPs) in das Zytoplasma (c) sowie deren Import in den Zellkern, wo das virale Genom transkribiert und repliziert wird (e). Virale mRNA (+) wird in das Zytoplasma exportiert (f). Hier kommt es zur Synthese viraler Proteine (g). Von diesen werden einige in den Kern importiert (h), wo sie der Replikation des viralen Genoms dienen und mit der *de novo* synthetisierten vRNA (-) zu neuen vRNPs assemblieren (i). Die neu gebildeten vRNPs werden M1- und NS2-abhängig aus dem Zellkern transportiert (j) und assemblieren an der apikalen Zellmembran mit den restlichen Virusbestandteilen (k), wo es zur Abschnürung und Freisetzung der Viren kommt (l) (Whittaker 2001).

1.2.5 Pathogenese und Epidemiologie

Influenza A Viren besitzen ein breites Wirtsspektrum, welches neben Vögeln verschiedene Säugetiere wie den Menschen, Schweine, Pferde, Hunde, Katzen sowie verschiedene Marderarten (Frettchen, Steinmarder, Nerz) und Meeressäuger (Seehunde, Wale) mit einschließt. Wildwasservögel stellen das ursprüngliche Reservoir aller Influenza A Viren dar (Webster et al. 1992). Eine Influenza A Virusinfektion bleibt hier in der Regel asymptomatisch, was auf eine optimale Adaption durch Koevolution an den natürlichen Wirt hindeutet. Innerhalb dieser Vogelpopulationen zirkulieren alle bisher bekannten 16 H- und 9 N-Subtypen (Webster et al. 1992). Saisonal zirkulierende Influenza A Viren sind auf die Subtypen H1, H2, H3, N1 und N2 beschränkt, welche alle direkt oder indirekt auf den Genpool aviärer Influenza A Viren zurückgehen und derzeit als saisonale Influenza A Viren in der humanen Population zirkulieren (Abbildung 4).

Influenza A Viren sind genetisch sehr variabel, was es ihnen ermöglicht die Immunabwehr des Menschen immer wieder zu überwinden. Diese Variabilität ist im Wesentlichen auf zwei Eigenschaften des Virus zurückzuführen.

Zum einen besitzen virale RNA-Polymerasen keine Korrekturfunktion. Die vielen Kopierfehler, welche während der Replikation des viralen Genoms entstehen (Drake 1993; Aggarwal et al. 2010), führen zu der Entstehung einer Vielzahl von Nachkommenviren, welche sich gegenüber dem ursprünglich infizierenden Virus genetisch leicht unterscheiden. Bei diesen Veränderungen handelt es sich meist um Punktmutationen. Da diese nach jedem Infektionszyklus auftreten, führen sie zu einer schrittweisen Variation des viralen Genoms. Dieser Prozess wird auch als *Antigen-Drift* bezeichnet. Die kontinuierlichen genetischen Veränderungen betreffen auch die HA- und NA-Segmente, wodurch die Wechselwirkungen der viralen Oberflächenantigene mit potentiell vorhandenen Antikörpern mehr oder weniger geschwächt werden (Wiley et al. 1981). Dies ist eine wesentliche Ursache der jährlich auftretenden Influenza-Epidemien.

Zum anderen besitzen Influenza A Viren ein segmentiertes RNA Genom. Wird eine Zelle von zwei unterschiedlichen Influenza A Viren infiziert, kann es nach der RNA-Replikation zu einem Austausch eines oder mehrerer Gensegmente kommen. Dies wird auch als *Antigen-Shift* bezeichnet (Chen and Deng 2009). Die dabei entstehenden Reassortanten können neue pathogene Eigenschaften aufweisen. Von besonderer Bedeutung sind Reassortierungen bei denen es zu einem Austausch der HA- und/oder NA-Segmente kommt. Die dabei entstehenden Nachkommenviren können zudem völlig neue immunologische Eigenschaften

besitzen und somit Ursache einer neuen Pandemie sein. Auf Grund der immunologischen Naivität der Bevölkerung kann es in Folge zu einer hohen Infektionsrate mit schneller Ausbreitung kommen. Die Einführung eines neuen HA oder NA kann nicht nur durch Reassortierung, sondern auch direkt durch Interspezies-Übertragung geschehen. Dies war wahrscheinlich der Fall bei der spanischen Grippe von 1918. Man geht davon aus, dass es zu der direkten Übertragung eines aviären H1N1 Virus auf den Menschen kam, wobei das Virus an die Replikation im menschlichen Wirt adaptierte (Webster et al. 1992). Das Virus, welches für die Pandemie von 1957 verantwortlich war, entstand aus der Reassortierung des zu der Zeit saisonalen mit einem aviären Virus, wobei die Gensegmente für HA (H2), NA (N2) und PB1 von dem aviären Virus stammten (Scholtissek et al. 1978; Kawaoka et al. 1989). Die Pandemie von 1968 verursachte ein Virus, welches ein aviäres HA (H3) und PB1 Segment auf dem genetischen Hintergrund eines saisonalen humanpathogenen Virus enthielt (Scholtissek et al. 1978; Kawaoka et al. 1989). Sobald ein neuer Subtyp in die menschliche Population eintritt, verdrängt er in der Regel den vorher zirkulierenden Subtyp. Eine Ausnahme bildet das 1977 wieder aufgetauchte A/H1N1 (Kung et al. 1978; Nakajima et al. 1978), welches seitdem mit A/H3N2 in der menschlichen Population koziirkuliert. Seit dem Frühjahr 2009 verbreitete sich ein neues A/H1N1 Virus und führte zur ersten Pandemie des 21. Jahrhunderts. Seit 2010 zirkuliert das Virus zusammen mit den saisonalen Viren in der Bevölkerung (Oh and Hurt 2014).

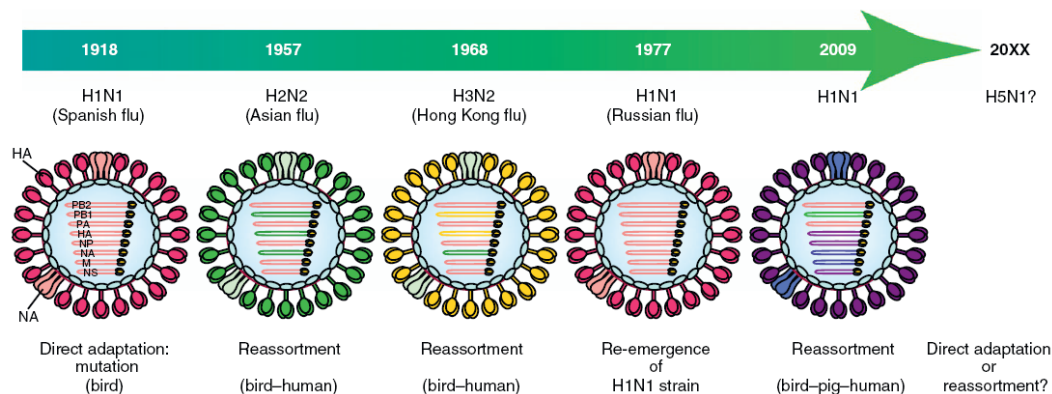


Abbildung 4: Evolution der pandemischen Influenzaviren.

Die Pandemien des zwanzigsten Jahrhunderts wurden durch Infektion mit einem aviären Virus (1918) oder mit aviär-humanen Reassortanten (1957 & 1968) verursacht. Das H1N1 Virus, welches in den 50er Jahren zirkulierte, trat 1977 wieder pandemisch auf und koziirkuliert seitdem mit H3N2. Die bisher letzte Influenza Pandemie wurde durch eine aviär-porzin-humane Reassortante verursacht (Watanabe et al. 2012).

1.2.5.1 Saisonale Influenza A Viren

Influenzaviren sind weltweit verbreitete Erreger, welche die Epithelzellen des Respirationstraktes infizieren und schwere Krankheitsverläufe mit Todesfolge verursachen können. Im Rahmen der saisonalen Influenza-Epidemie werden jedes Jahr 5-15% der Bevölkerung infiziert, wobei nach Schätzungen der WHO jedes Jahr weltweit durchschnittlich 3 bis 5 Millionen schwere Krankheitsfälle und 250.000 bis 500.000 tödlich verlaufende Fälle auftreten (WHO 2003). Der Schweregrad der jeweiligen Influenza-Epidemie kann jedoch stark variieren.

Influenzaviren werden vor allem durch Tröpfchen- und Schmierinfektion übertragen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 bis 3 Tagen ist die klinische Symptomatik durch einen plötzlichen Erkrankungsbeginn mit Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), trockenem Reizhusten, Halsschmerzen und Muskel- und/oder Kopfschmerzen gekennzeichnet. Die Erkrankung klingt in der Regel nach 5 bis 7 Tagen komplikationslos ab (RKI 2011). In Abhängigkeit von der Virulenz des Erregers und dem Alter, eventuellen Vorerkrankungen und Immunstatus des Patienten kann es jedoch zu schweren Verläufen kommen. So treten Komplikationen vor allem bei älteren (≥ 65 Jahre) und immunsupprimierten Patienten, Säuglingen und Patienten mit chronischen Erkrankungen (Asthma, COPD, Herz-Kreislauf-, Leber- und Nierenkrankheiten, Diabetes) auf, wobei pulmonale Komplikationen am häufigsten sind (Rothberg et al. 2008; Mertz et al. 2013). Die durch das Virus selbst verursachte primäre Influenzaviruspneumonie ist eine der schwersten Verlaufsformen. Sie tritt bei saisonaler Influenza jedoch eher selten auf. Häufiger sind sekundäre Pneumonien ausgelöst durch bakterielle Infektionen, vor allem durch *Streptococcus pneumoniae* (Grabowska et al. 2006), *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* (Shanks and Brundage 2012). Des Weiteren können Exazerbationen chronischer Lungenerkrankungen auftreten (RKI 2011).

1.2.5.2 Hochpathogene aviäre Influenza (HPAI) A Viren

Aviäre Influenza A Viren lassen sich anhand ihrer Pathogenität in Hühnern in niedrigpathogene aviäre (LPAI) und hochpathogene aviäre Influenza (HPAI) A Viren einteilen (Alexander 2000). HPAI Viren sind auf die Subtypen H5 und N7 beschränkt, obwohl die Mehrzahl der Viren dieser Subtypen den LPAI Viren zuzuordnen ist (Swayne and Suarez 2000). Die meisten aviären Influenza A Viren replizieren vor allem in Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts von Vögeln. HPAI Viren können in Zuchtgeflügelbeständen zu plötzlich

einsetzenden, schweren systemischen Erkrankungen und innerhalb von 48 Stunden zu einer bis zu 100%igen Mortalität führen (Swayne and Suarez 2000). In Wildvögeln, welche ihre natürlichen Wirte darstellen, verursachen aviäre Influenzaviren im Allgemeinen keine Erkrankung (Webster et al. 1992). Seit 2002 werden jedoch in Wildvögeln unterschiedlicher Art fatal verlaufende H5N1 Fälle beschrieben (Ellis et al. 2004; Sturm-Ramirez et al. 2004; Liu et al. 2005; Keawcharoen et al. 2008). Die Pathogenität der HPAI Viren lässt sich zumindest teilweise auf die multibasische Spaltstelle im Hämagglutininvorläuferprotein HA₀ zurückführen (Rott et al. 1995). Die post-translationale proteolytische Spaltung des HA₀ in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ ist Voraussetzung für die Infektiosität der Viruspartikel. Humanpathogene und LPAI Viren besitzen ein einzelnes Arginin an der HA-Spaltstelle, welche durch Trypsin oder extrazelluläre trypsinartige Proteasen wie z.B. der im menschlichen Respirationstrakt vorkommenden Protease Clara gespalten wird. Dementsprechend bleibt die Infektion mit diesen Viren lokal begrenzt (Horimoto and Kawaoka 1994). Dagegen besitzen HPAI Viren an der HA-Spaltstelle mehrere basische Aminosäuren (Arginin, Lysin) (Bosch et al. 1981; Vey et al. 1992; Wood et al. 1993; Senne et al. 1996), welche auch als „multibasische Spaltstelle“ bezeichnet werden. Diese kann durch zelluläre ubiquitär vorkommende Proteasen wie z.B. Furin oder PC6 gespalten werden (Stieneke-Grober et al. 1992; Horimoto et al. 1994), wodurch es zu schweren systemischen Infektionen kommen kann (Horimoto and Kawaoka 1994), die mit einer hohen Mortalität einhergehen.

Als weiterer Pathogenitätsfaktor sind einige Mutationen in den Proteinen des viralen RNA Polymerase Komplexes beschrieben, welche zu einer besseren Replikation aviärer Viren in Säugern beitragen. So zeigte Hatta et al. 2001, dass die Mutation E627K in PB2 zu einer verstärkten Virulenz des H5N1 Virus in Mäusen führt (Hatta et al. 2001). Zudem führte die Aminosäuresubstitution N66S in PB1-F2 zu erhöhter Virulenz des pandemischen H1N1 Virus von 1918 und H5N1 Viren im Mausmodell. Es zeigte sich ein starker Anstieg des Virustiters und proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- α , in der Lunge (Conenello et al. 2007).

Das HPAI H5N1 Virus wurde 1996 erstmalig aus einer erkrankten Gans in Zuchtbeständen in der südchinesischen Provinz Guangdong isoliert (Xu et al. 1999). Im Jahr 1997 wurde für das Virus dann zum ersten Mal das Überwinden der aviär-humane Speziesbarriere dokumentiert. In diesem Jahr kam es während eines H5N1 Ausbruchs in Geflügelbeständen in Hongkong zur direkten Übertragung auf den Menschen. Von insgesamt 18 infizierten Personen starben 6 in Folge der Erkrankung (Claas et al. 1998; Subbarao et al. 1998). Im Januar 2003 kam es in Hongkong zu zwei weiteren bestätigten Übertragungen des H5N1 Virus auf den Menschen

(Peiris et al. 2004). Seitdem breitete sich das Virus von Südostasien über Zentralasien kontinuierlich nach Westen bis nach Europa und Afrika aus (Sonnberg et al. 2013). Bis heute sind in bisher 63 Ländern jedes Jahr eine Vielzahl von H5N1 Ausbrüchen in Zuchtgeflügel aufgetreten. In einigen Ländern wie z.B. China, Vietnam oder Bangladesch zirkuliert das Virus endemisch in den Geflügelbeständen (FAO 2011). Die Übertragung des Virus auf den Menschen erfolgt über engen Kontakt mit erkrankten oder toten Vögeln. Bisher konnte eine Mensch zu Mensch Übertragung nur in extrem seltenen Fällen beschrieben werden (Ungchusak et al. 2005; Wang et al. 2008). Die genetische Variabilität der Influenza A Viren birgt jedoch das Risiko, dass das H5N1 Virus durch schrittweise Adaption oder durch Reassortierung mit einem bereits human-adaptierten Virus Eigenschaften entwickelt, welche zukünftig eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ermöglichen könnten. Aus diesem Grund wird das H5N1 Virus als potenzieller Erreger einer neuen globalen Pandemie diskutiert (Klempner and Shapiro 2004; Webster and Govorkova 2006). Bis heute zählt man weltweit 784 labordiagnostisch bestätigte H5N1 Virusinfektionen in insgesamt 16 Ländern, wobei die Letalität ca. 55% beträgt (WHO, 03.03.2015).

Im Gegensatz zu saisonalen Influenza Viren infizieren HPAI A Viren bevorzugt die Epithelien der unteren Atemwege, was häufig zu der raschen Entwicklung einer primären viralen Pneumonie (To et al. 2001; Soepandi et al. 2010) mit schwerem akuten Lungenschaden (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) führt. Von 26 labordiagnostisch bestätigten H5N1 Fällen aus 12 verschiedenen chinesischen Provinzen, die zwischen Oktober 2005 und April 2008 auftraten, entwickelten 88% ein ARDS von denen 75% der Fälle tödlich verliefen (Yu et al. 2008). Typische Befunde sind außerdem Lymphopenie (Tran et al. 2004), Hämophagozytose und multiples Organversagen (Yuen et al. 1998; Yu et al. 2008). Fatal verlaufende H5N1 Infektionen gehen außerdem mit einer hohen Viruslast und der Dysregulation proinflammatorischer Zytokine und Chemokine einher (de Jong et al. 2006). Diese Hyperinduktion proinflammatorischer Zytokine wird auch als Hyperzytokinämie oder „Cytokinstorm“ bezeichnet. Zudem konnte das Virus, virales Antigen oder virale RNA in einigen H5N1-Patienten auch außerhalb des Respirationstraktes nachgewiesen werden, was eine potentielle systemische Verbreitung des Virus im Menschen aufzeigt (Uiprasertkul et al. 2005; de Jong et al. 2006; Gu et al. 2007). Ob es jedoch üblicherweise zu einer Vermehrung des Virus außerhalb des Respirationstraktes kommt und welche Rolle dies für die Pathogenese spielt, ist bisher nicht geklärt.

1.2.5.3 Pandemisches A(H1N1) 2009 Virus

Im Frühjahr 2009 traten in Mexico erste Fälle eines bislang neuen Influenzavirus im Menschen auf (Perez-Padilla et al. 2009). In den folgenden Monaten breitete sich das Virus durch Mensch-zu-Mensch-Übertragung weltweit aus und führte zur ersten Influenzapandemie seit 1968/69. Das als pandemisches Influenzavirus A(H1N1) 2009 (A(H1N1)pdm09) bezeichnete Virus weist gegenüber den bisher saisonal zirkulierenden Erregern des Subtyps A/H1N1 wesentliche Unterschiede in seiner genetischen Zusammensetzung auf (Dawood et al. 2009) und ist daher als ein neues Virus zu betrachten. Die genetische Zusammensetzung des Virus zeigte, dass es aus der Reassortierung eines eurasischen vogelähnlichen porcinen Virus (NA, M) mit einer Triplereassortante aus einem klassischen porcinen (HA, NP, M, NS), einem nordamerikanischen aviären (PB2, PA) und einem humanpathogenen H3N2 Virus (PB1, NA) hervorging (Medina and Garcia-Sastre 2011). Im Gegensatz zur saisonalen Influenza infizierten sich vor allem junge Menschen. So waren ca. 60% der Patienten unter 18 Jahre alt (Dawood et al. 2009). Im Vergleich zu vorangegangenen Influenzapandemien, aber auch gegenüber der saisonalen Influenza, ist die Letalität der H1N1pdm Virus-Infektion im Menschen mit Schätzungsweise 0,2% - 1,23% relativ gering (Neumann and Kawaoka 2011). Ähnlich zu saisonalen Influenza Viren infiziert das A(H1N1)pdm09 vor allem die Epithelien des oberen Respirationstrakts, wobei die Erkrankung in der Regel einen milden Verlauf nimmt (Dawood et al. 2009; Neumann and Kawaoka 2011). Trotzdem entwickeln einige Patienten eine primäre virale Pneumonie, welche in einigen Fällen zu einem ARDS und zum Tod führte (Dawood et al. 2009; Zarocostas 2009; Neumann and Kawaoka 2011). Bestimmte Faktoren erhöhen das Risiko für Komplikationen und schwere Verläufe. Dabei sind vor allem schwangere Patienten, Patienten mit Immunsupprimierung, chronischen Vorerkrankungen wie z.B. Asthma oder Diabetes und extremem Übergewicht betroffen (Neumann and Kawaoka 2011). Ungeachtet dessen traten auch schwere Verläufe bei Patienten ohne Vorerkrankungen auf. Zudem zeigen Infektionsexperimente im Tiermodell, dass das A(H1N1)pdm09 gegenüber saisonalen Viren deutlich stärker pulmonal repliziert (Itoh et al. 2009; Maines et al. 2009; Munster et al. 2009) und zu pathologischen Läsionen der Lunge führt (Itoh et al. 2009). Weiterhin war in post mortem Lungengewebe fatal verlaufender Fälle der pandemischen H1N1 Influenza von 2009 eine hohe Viruslast nachweisbar (Gao et al. 2013). Zusammen indizieren die Arbeiten, dass sich das neue A(H1N1)pdm09 Virus hinsichtlich seiner Pathogenität durchaus von anderen saisonalen Viren unterscheidet.

Im August erklärte die WHO das Ende der A(H1N1)pdm09 Virus Pandemie. Seit dem zirkuliert das Virus zusammen mit den saisonalen H1N1 und H3N2 Viren in der Bevölkerung und hat mittlerweile die bisher saisonalen H1N1 Viren verdrängt (RKI 2014; WHO 2014).

1.2.5.4 Neues Influenzavirus A (H7N9)

Anfang des Jahres 2013 wurde in China ein neues Influenza A (H7N9) Virus isoliert, welches 3 Patienten aus Shanghai und der Provinz Anhui infiziert hatte (Gao et al. 2013). Damit wurden zum ersten Mal H7N9-Virusinfektionen im Menschen festgestellt. Genetische Analysen ergaben, dass es sich bei dem neuen Influenzavirus A (H7N9) um eine Triplereassortante handelt, dessen Genom sich aus Gensegmenten von mindestens 3 verschiedenen niedrigpathogenen aviären Viren zusammensetzt (Gao et al. 2013; Liu et al. 2013). Im Gegensatz zu hochpathogenen H5N1 Viren besitzt das neue Influenzavirus A (H7N9) keine multibasische Spaltstelle (Chen et al. 2013; Gao et al. 2013; Kageyama et al. 2013). Zudem verläuft die Infektion mit dem neuen Influenzavirus A (H7N9) in Zuchtgeflügelbeständen asymptomatisch oder mild. Das Virus gilt daher nicht als hochpathogenes aviäres Virus. Trotzdem führt die H7N9-Infektion im Menschen zu ernsthaften Erkrankungen des Respirationstrakts, was häufig in einer schnell fortschreitenden Pneumonie mit ARDS bis hin zu einem septischen Schock mit Multiorganversagen resultiert (Gao et al. 2013). Die Letalität im Menschen ist dementsprechend hoch. Von den bisher 568 bestätigten Fällen verliefen 204 tödlich (ECDC; Stand 12.02.15). Bei dem H7N9-Influenzavirus handelt es sich um einen Zoonoseerreger. Trotzdem konnten bisher mehrere Fälle von Mensch-zu-Mensch-Übertragung dokumentiert werden (Liu et al. 2015).

Zudem fand sich eine effiziente Replikation des Virus im unteren Respirationstrakt von Mäusen, Frettchen, Schweinen und Makaken (Belser et al. 2013; Mok et al. 2013; Watanabe et al. 2013; Zhu et al. 2013), was für ein aviäres Virus mit niedriger Pathogenität ungewöhnlich ist.

1.2.6 Wirtsspezifität und Speziesbarriere

Man geht davon aus, dass die Wirtsspezifität vor allem mit der Rezeptorpräferenz des Virus verknüpft ist. Influenzaviren binden mittels ihres HA-Proteins an Oberflächenrezeptoren auf der Zielzelle. Dies sind Glykolipide oder Glykane mit endständigen Sialinsäuren, welche über

eine $\alpha 2,3$ - (SA $\alpha 2,3$ Gal) oder $\alpha 2,6$ -glykosidische Bindung (SA $\alpha 2,6$ Gal) mit Galaktose verknüpft sind.

In früheren Studien zeigte sich, dass die Rezeptorpräferenz anscheinend von der Spezies abhängig ist, aus der die Viren isoliert wurden. Humane Isolate binden vorrangig an $\alpha 2,6$ -verlinkte Sialinsäuren, während aviäre Isolate $\alpha 2,3$ Gal-Verknüpfungen bevorzugen (Rogers and Paulson 1983) (Abbildung 5A). Beide Rezeptoren konnten sowohl im Respirationstrakt des Menschen (Baum and Paulson 1990; Shinya et al. 2006) als auch im Gastrointestinal- und Respirationstrakt von Vögeln (Gambaryan et al. 2002; Wan and Perez 2006; Guo et al. 2007; Kimble et al. 2010; Pillai and Lee 2010) nachgewiesen werden.

Die Mutation bestimmter Aminosäuren in der Rezeptorbindedomäne des HA scheint für die Verschiebung der Wirtsspezifität von aviär zu human wesentlich zu sein. So sind beispielsweise die Reste E190, G225, Q226 und G228 bei aviären Viren hoch konserviert (Matrosovich et al. 1997), wobei bei humanen Isolaten vom Subtyp H1 die Substitutionen E190D und G225D, und bei humanen Isolaten vom Subtyp H2 und H3 die Substitutionen Q226L und G228S stattfanden (Matrosovich et al. 1997). Tatsächlich ergaben Virusbindungsassays, dass bei den Subtypen H2, H3, H4 und H9 vor allem die Aminosäuresubstitutionen Q226L und G228S zu einem Wechsel der Affinität von $\alpha 2,3$ Gal- zu $\alpha 2,6$ Gal-Verknüpfungen führen. Bei Viren des Subtyps H1 sind die Mutationen E190D und G225D für einen Wechsel von $\alpha 2,3$ Gal- zu $\alpha 2,6$ Gal-Verknüpfungen entscheidend (Glaser et al. 2005; Stevens et al. 2006). Beide Rezeptoren waren im Respirationstrakt des Menschen nachweisbar (Baum and Paulson 1990), wobei Shinya et al. zeigte, dass der humane Rezeptor (SA $\alpha 2,6$ Gal) sowohl in den oberen als auch in den unteren Atemwegen vorkommt, während aviäre Rezeptoren (SA $\alpha 2,3$ Gal) vorrangig in den unteren jedoch kaum in den oberen Atemwegen des Menschen detektierbar sind (Shinya et al. 2006) (Abbildung 5B). Es wurde spekuliert, dass diese Rezeptorverteilung der Grund für die ineffiziente Mensch-zu-Mensch Übertragung von H5N1 Viren ist.

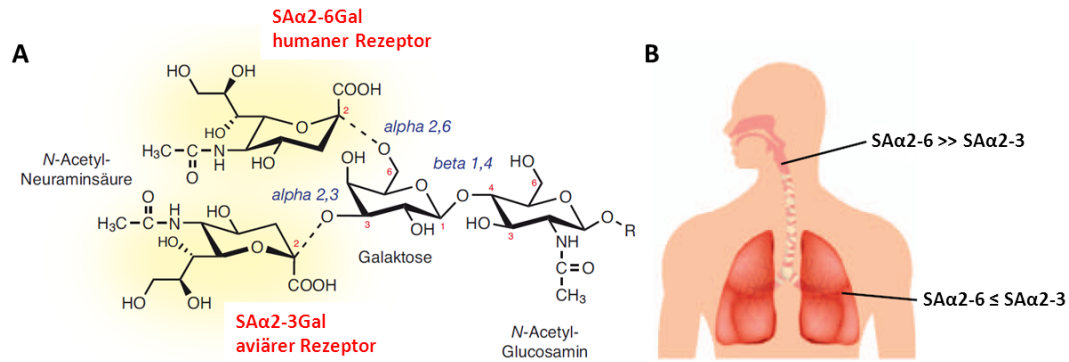


Abbildung 5: Humaner (SA α 2-6Gal) und aviärer Influenzavirus Rezeptor (SA α 2-3Gal).

(A) Sialinsäurereste (N-Acetyl-Neuraminsäure), die über eine α 2-6- oder eine α 2-3-glykosidische Bindung an das folgende Galaktosemolekül verknüpft sind, dienen als Rezeptoren für humane bzw. aviäre Influenza A Viren. (B) Verteilung der α 2-6 und α 2-3 verknüpften Sialinsäurereste im menschlichen Respirationstrakt. Während die Expression von α 2-3 Sialinsäureresten in den oberen Atemwegen des Menschen äußerst gering ist, kommen sie in den unteren Atemwegen häufiger vor (modifiziert nach (Stevens et al. 2006) und (Watanabe et al. 2012)).

1.3 Coronaviren

Coronaviren gehören der Familie der Coronaviridae an. Es handelt sich um behüllte Viren deren Genom als einzelsträngige RNA positiver Polarität organisiert ist. Mit einer Größe von ca. 27,3 – 31,3 kb ist es das größte Genom aller bekannten RNA-Viren (Gorbalenya et al. 2006). Coronaviren werden auf Grund genetischer und serologischer Eigenschaften in Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren eingeteilt. Vertreter dieser Gruppen infizieren vor allem den oberen Respirationstrakt sowie den Gastrointestinaltrakt verschiedener Säugetiere und Vögel. Mit den Coronaviren HCoV-229E, -OC43, -NL63 und -HKU1 sind bisher vier humopathogene endemische Vertreter bekannt, welche im Menschen meist leichte Erkältungskrankheiten hervorrufen (Geller et al. 2012). In den Jahren 2002 – 2003 führte das deutlich virulentere und bis dahin unbekannte Severe Acute Respiratory Syndrome-associated Coronavirus (SARS-CoV) im Menschen zu schweren Erkrankungen des unteren Respirationstraktes (Drosten et al. 2003; Peiris et al. 2004). Im Verlauf der Pandemie kam es weltweit zu 8273 Erkrankungen mit 775 Todesfällen (WHO 2003).

1.3.1 Morphologie und Aufbau

Bei Coronaviren handelt es sich um behüllte Viren mit einer eher sphärischen bis pleomorphen Form (Abbildung 6). Die Virionen haben einen Durchmesser von ca. 80 – 120 nm (Masters 2006). In der Lipiddoppelschicht sind in der Regel drei Oberflächenproteine

verankert, wobei das Spikeprotein (S) mit seiner keulenartigen Form das markanteste ist, da es als Homotrimer ca. 17 – 20 nm über die Virushülle hinaus ragt und somit zu der Corona-artigen Erscheinung des Virus beiträgt (Masters 2006). Das Spikeprotein (S) dient der Interaktion mit dem zellulären Rezeptor (Collins et al. 1982). Zwei weitere, in der Virushülle enthaltene Strukturproteine, sind das Membranprotein (M) und das Envelopeprotein (E). Beides sind eher kleinere Transmembranproteine und spielen eine essentielle Rolle beim Zusammenbau der Virionen (Yu et al. 1994; de Haan and Rottier 2005; Liao et al. 2006; Boscarino et al. 2008). Einige Coronaviren enthalten zusätzlich die Hämagglutininesterase (HE), welche als Homodimere kleinere Spikes in der Membran bilden (Callebaut and Pensaert 1980; Sugiyama and Amano 1981; Patel et al. 1982; Guy et al. 2000). Die Hämagglutininesterase dient der initialen reversiblen Bindung des Virus an Sialinsäuren auf der Zielzelle. Innerhalb der Virushülle liegt das Nukleokapsidprotein (N), welches das RNA-Genom komplexiert und eine helikale Kapsidstruktur bildet (Sturman et al. 1980). Das Kapsid ist durch die Interaktion des Nukleoprotein (N) mit dem Membranprotein (M) mit dem inneren der Virushülle verbunden.

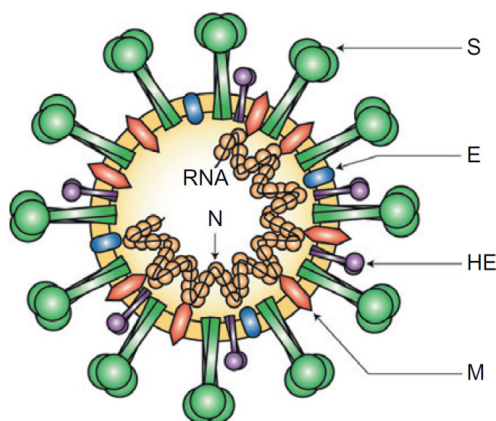


Abbildung 6: Aufbau von Coronaviren.

Die helikale Kapsidstruktur befindet sich innerhalb der Virushülle und wird durch das Nukleokapsidprotein (N) gebildet, welches das RNA-Genom komplexiert. In der Virushülle eingelagert sind das glykosylierte Spikeprotein (S), das Membranprotein (M) und das Envelopeprotein (E). Einige Coronaviren enthalten in der Virushülle zusätzlich das Hämagglutininesterase Glycoprotein (HE) (Weiss and Leibowitz 2011).

1.3.2 Replikationszyklus

Das S-Protein bindet an den Rezeptor auf der Zellmembran und vermittelt die Aufnahme des Virus in die Zelle. Dies geschieht entweder durch Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran oder der endosomalen Membran (Gorbalenya et al. 2006). Das RNA-Genom

wird in das Zytoplasma freigesetzt. Die offenen Leseraster ORF1a und ORF1b werden hier durch die Translationsmaschinerie der Wirtszelle translatiert. Die beiden entstehenden Polypeptide Pp1a und Pp1b bilden nach autoproteolytischer Prozessierung den viralen Transkriptions-Replikationskomplex, welcher das komplette virale RNA-Genom in RNA negativer Polarität umschreibt (Gorbalenya et al. 2006). Diese dient als Vorlage zur Synthese des RNA-Genoms positiver Polarität. Parallel wird durch eine diskontinuierliche Transkriptionsstrategie ein Pool subgenomischer RNAs negativer Polarität generiert (Sawicki and Sawicki 2005). Diese diskontinuierlichen RNAs dienen dann als Matrize zur Synthese von mRNAs positiver Polarität (Sawicki and Sawicki 1990; Sawicki and Sawicki 1995; Sawicki and Sawicki 1998). Die Translation der viralen Membranproteine erfolgt an membrangebundenen Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) und die der restlichen Proteine an freien Ribosomen. Das Nukleokapsidprotein (N) assembliert mit der genomischen RNA zum helikalen Nukleokapsidkomplex. Durch Interaktion des N-Protein mit dem membranständigen M-Protein kommt es zwischen ER und Golgi-Apparat zur Abschnürung und Freisetzung neuer Viruspartikel in intrazelluläre Vesikel. Schließlich werden die Vironen durch Exozytose freigesetzt (Gorbalenya et al. 2006) (Abbildung 7).

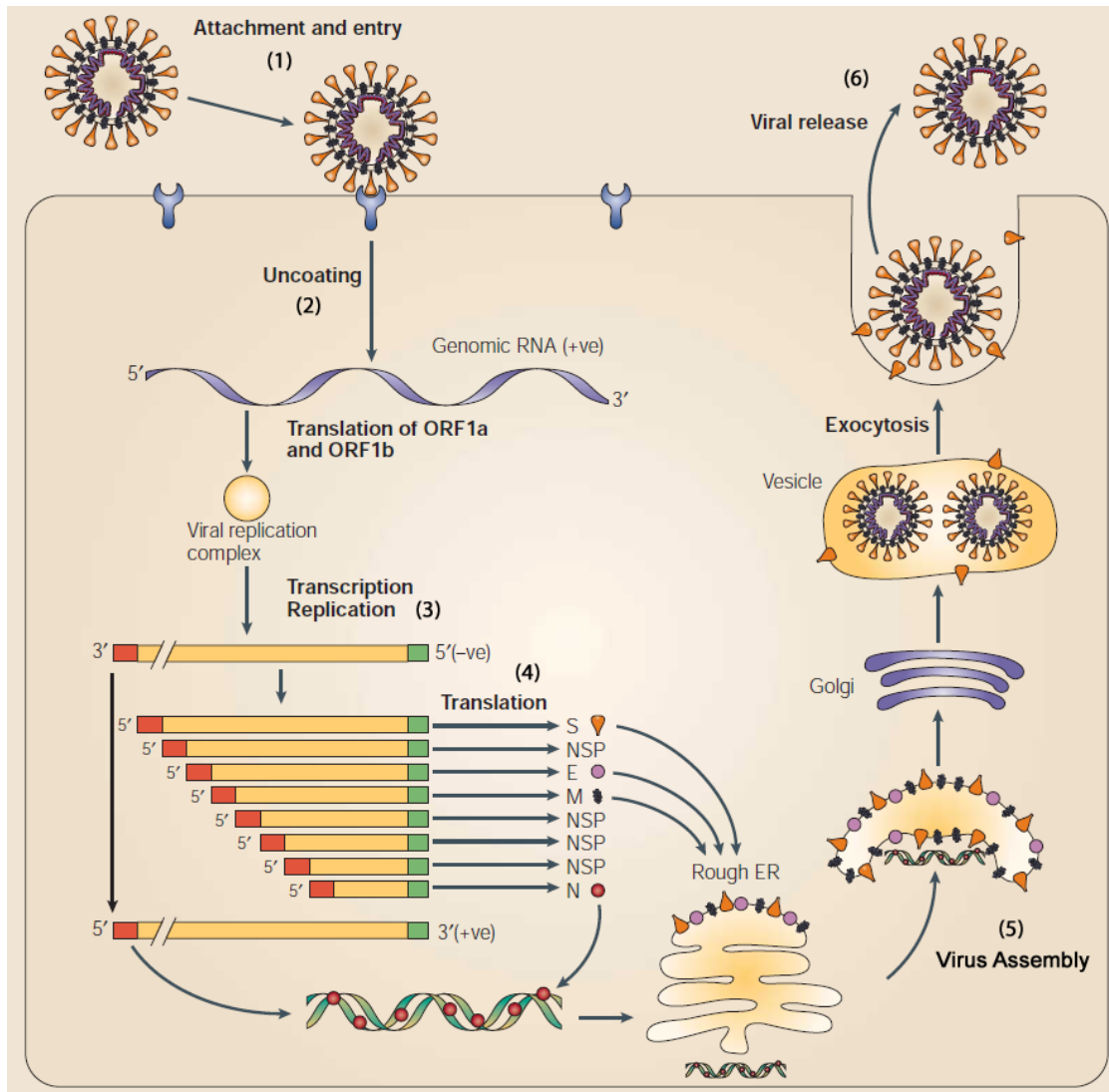


Abbildung 7: Replikationszyklus von Coronaviren:

(1) Bindung und Eintritt des Virus in die Zelle. (2) Fusion von Virus- und Zellmembran und Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma. (3) Replikation des viralen Genoms, Generierung subgenomischer RNAs und Transkription der mRNAs. (4) Translation von Struktur- (S, E, M, N) und nicht-Strukturproteinen (NSPs). (5) Assemblierung neuer Viruspartikel. (6) Freisetzung der Virionen (Stadler et al. 2003).

1.3.3 Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)

Im Sommer 2012 wurde in Saudi Arabien ein bis dahin unbekanntes Coronavirus aus dem Sputum eines Patienten mit schwerer akuter Pneumonie und Nierenversagen isoliert (Zaki et al. 2012). Auf der Grundlage von Sequenzvergleichen des viralen Genoms wurde das Virus der Gattung der Betacoronaviren zugeordnet (van Boheemen et al. 2012) und zunächst als humanes Coronavirus Erasmus Medical Center (hCoV EMC) bezeichnet (Zaki et al. 2012). Als das Virus kurze Zeit später aus weiteren Patienten isoliert wurde, welche aus Jordanien, Saudi

Arabien, Katar und den Vereinigten Arabischen Emiraten stammten, wurde die Bezeichnung des Virus in Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) geändert (de Groot et al. 2013). Ähnlich zum SARS-CoV führt das MERS-CoV im Menschen zu schweren Erkrankungen des unteren Respirationstraktes. Der klinische Verlauf der SARS-CoV-Infektion variierte von leichten respiratorischen Erkrankungen bis hin zu schweren Pneumonien mit akutem Lungenversagen. Ca. 20% der Patienten entwickelten ein ARDS und benötigten künstliche Beatmung (Peiris et al. 2003). Histologische Untersuchungen an *post mortem* Lungengewebe von SARS-Patienten zeigten eine massive Schädigung der Lunge mit lokalen Hämorrhagien, nekrotischen Arealen und einem diffusem alveolaren Schaden, welcher sich unter anderem durch die Ablösung von Alveolarepithellenzellen aus dem Zellverband und die massive Exudation von Proteinen und Immunzellen in die Alveolie darstellte (Ding et al. 2003; Tsang et al. 2003).

Im Vergleich zur SARS-CoV-Infektion verläuft die MERS-CoV-Infektion jedoch mit einer deutlich höheren Letalität. Von den bisher weltweit 1041 bestätigten Fällen verliefen 383 tödlich (WHO; Stand 07.03.2015). Im Gegensatz zum SARS-CoV, welches sich über Tröpfcheninfektion durch Mensch-zu-Mensch-Übertragung innerhalb kurzer Zeit verbreitete, ist die MERS-CoV-Infektion offenbar eine Zoonose. Wobei jedoch Cluster von Mensch-zu-Mensch-Übertragung beobachtet wurden (Assiri et al. 2013; Guery et al. 2013; Memish et al. 2013). Die phylogenetische Analyse des Replikasegens des Virus ergab eine enge Verwandtschaft mit den in Fledermäusen vorkommenden Coronaviren HKU4 und HKU5 (van Boheemen et al. 2012). Studien deuten darauf hin, dass Fledermäuse das natürliche Reservoir von Coronaviren darstellen (Lau et al. 2005; Li et al. 2005; Vijaykrishna et al. 2007). Zudem konnten eng mit dem MERS-CoV verwandte Coronaviren aus europäischen und afrikanischen Fledermäusen isoliert werden, was auch den Ursprung des MERS-CoV in Fledermauspopulationen vermuten lässt (Annan et al. 2013; Ithete et al. 2013). Der begrenzte Kontakt zwischen Mensch und Fledermaus ließ jedoch die Existenz eines Zwischenwirtes vermuten, welcher für die wiederholte und häufige Übertragung auf den Menschen verantwortlich ist. Nachdem gezeigt wurde, dass Dromedare aus verschiedenen Regionen in Afrika und der arabischen Halbinsel Antikörper gegen MERS-CoV besitzen (Perera et al. 2013; Reusken et al. 2013; Meyer et al. 2014), erbrachten Azhar El et al. mit ihrer Studie den entgeltigen Beweis, dass Kamele die Überträger des Virus auf den Menschen sind (Azhar et al. 2014).

Das klinische Bild der MERS-CoV-Infektion im Menschen variiert von einer milden Infektion bis hin zu einer schweren Pneumonie mit akutem Atemnotsyndrom (ARDS), septischen Schock und Multiorganversagen mit tödlichem Ausgang. So entwickeln ca. 44% der Patienten eine Pneumonie und 12% ein ARDS (The Who Mers-Cov Research 2013). Ungefähr ein Drittel der Patienten zeigt zudem gastrointestinale Symptome. Einige der MERS-CoV-Infektionen gingen zudem mit akutem Nierenversagen einher (Bermingham et al. 2012; Zaki et al. 2012; Buchholz et al. 2013; Drosten et al. 2013; Guery et al. 2013). Besonders schwere klinische Verläufe wurden vor allem bei Patienten mit chronischen Vorerkrankungen, wie Diabetes, chronischer Niereninsuffizienz oder Herzerkrankungen zu beobachtet (The Who Mers-Cov Research 2013).

Obwohl das MERS-CoV im Menschen zu einem ähnlichen klinischen Bild wie das SARS-CoV führt, konnte gezeigt werden, dass beide Viren einen unterschiedlichen Rezeptor benutzten. Während das SARS-CoV das Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) als Rezeptor benötigt (Muller et al. 2012), wurde durch Raj et al. die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) als funktioneller Rezeptor des MERS-CoV identifiziert (Raj et al. 2013). Die multifunktionelle Typ II transmembrane Serinpeptidase wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert (Shin et al. 2008).

1.4 Der menschliche Respirationstrakt

Das respiratorische System des Menschen setzt sich aus den oberen und unteren Atemwegen sowie dem respiratorischen Lungengewebe zusammen. Zu den oberen Atemwegen gehören Nasenhöhle, Nasennebenhöhlen und Rachen, zu den unteren Kehlkopf, Trachea und Hauptbronchien, intrapulmonale Bronchien und Bronchiolen und zum respiratorischen Lungengewebe Alveolengänge und Alveolen. Die oberen und unteren Atemwege dienen der Luftleitung. Die eingeatmete Luft wird erwärmt, gereinigt und angefeuchtet. Das Lungengewebe dient dem Austausch der Atemgase Sauerstoff und Kohlendioxid (Welsch 2010). Die Atemwege verzweigen sich dichotom von der Trachea bis zu den Alveolarsäcken über 23 Generationen (Abbildung 8). Die Lichtung der Trachea und der Bronchien wird durch Knorpelspangen offengehalten. Diese werden in Richtung absteigendem Bronchialbaum immer weniger und sind bei den Bronchiolen nicht mehr zu finden. Obere Atemwege sowie Kehlkopf, Trachea und Hauptbronchien sind mit einem mehrreihigem hochprismatischen Epithel ausgekleidet, welches Flimmer-, Becher-, und Basalzellen enthält (Welsch 2010).

Flimmerzellen sind zilienträgende Zellen, welche der Bewegung des Flüssigkeits- bzw. Schleimfilms dienen. Der Schleimfilm wird von Tracheal- und Bronchialdrüsen sowie von Becherzellen produziert und bedeckt schützend das respiratorische Epithel (Welsch 2010). Becherzellen sind exokrine Drüsenzellen, welche die in der Zellgranula enthaltenen Muzine (Schleim) kontinuierlich über Exozytose an die Oberfläche abgeben. Die Dicke des respiratorischen Epithels nimmt Richtung absteigendem Bronchialbaum ab. Das Epithel der Bronchiolen ist einschichtig prismatisch und enthält vor allem Flimmerzellen und Clara-Zellen (Boers et al. 1999). Dies sind zilienfreie sekretorische Zellen (Welsch 2010). Sie sezernieren eine Reihe von Proteinen, die der Immunabwehr und der Begrenzung von Entzündungsreaktionen dienen (Jorens et al. 1995; Shijubo et al. 2003).

Generation	Structure	Anatomy	Epithelium	Cell Type
0	Trachea			
1	Primary bronchi		Bronchial Epithelium	Ciliated Cell Basal Cell Intermediate Cell Clara Cell
2	Secondary bronchi			
3	Tertiary bronchi			
4	Small bronchi			
5	Bronchioles		Bronchiolar Epithelium	Goblet Cell (Discharging Mucus) Alveolar Macrophage
6-16	Terminal bronchioles			
			Alveolar Epithelium	Type I Alveolar Epithelial Cell Type II Alveolar Epithelial Cell
17-19	Respiratory bronchioles			
23	Alveolar sacs			

Abbildung 8: Aufzweigungen und Epithelien der unteren Atemwege des Menschen.

Die Verzweigungsgenerationen teilen sich von der Trachea (Generation 0) bis zu den Alveolarsäcken (Generation 23) über 23 Generationen auf. Knorpelspangen (blau) sind bis zur 4. Verzweigungsgeneration enthalten. Die Trachea und die Hauptbronchien sind mit einem mehrreihigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet, welches Flimmer-, Becher-, Basal-, und Übergangszellen enthält. Die Bronchiolen sind mit einem einschichtigen prismatischen Epithel ausgekleidet, welches Flimmer- und Clarazellen enthält. Das Alveolarepithel besteht aus Typ I und Typ II Zellen. Außerdem liegen hier oft Alveolarmakrophagen auf (modifiziert nach (Berube et al. 2010)).

Die letzte Teilungsgeneration der Bronchiolen wird als terminaler Bronchiolus bezeichnet, diesem folgt dann der respiratorische Bronchiolus. Er bildet eine Übergangsregion zwischen den Atemwegen und dem Alveolarraum. Aus dem letzten respiratorischen Bronchiolus gehen die Alveolargänge hervor. Sie sind nicht durch eine eigene Wand abgegrenzt, sondern eher durch die freien Kanten der Alveolarsepten. Sie enden jeweils blind mit einer Gruppe von Alveolen, dem Alveolarsack. In den bläschenförmigen Alveolen findet der Gasaustausch statt (Welsch 2010). Die Alveoli sind durch schmale Alveolarsepten voneinander getrennt, welche beidseitig mit Alveolarepithel bedeckt sind. Das Alveolarepithel besteht aus zwei unterschiedlichen Zelltypen: den Alveolarepithelzellen Typ I (Pneumozyten Typ I) und den Alveolarepithelzellen Typ II (Pneumozyten Typ II) (Welsch 2010).

Vor allem die Typ I Zellen tragen zur alveolären Auskleidung bei. Sie bedecken die alveolaren Septen zu 95%, wobei sie lediglich 8% der Zellen in den unteren Atemwegen ausmachen (Crapo et al. 1982). Es handelt sich um flache Zellen mit großflächiger zytoplasmatischer Ausdehnung. Die Basalmembran der Typ I Zelle und das Endothel der pulmonalen Kapillaren verschmelzen miteinander und bilden so die Blut-Luft Schranke, eine extrem dünne Barriere für den Gasaustausch (Welsch 2010). Typ I Zellen können im Gegensatz zu Typ II Zellen nicht mehr proliferieren.

Typ II Zellen bedecken nur ca. 5% der alveolären Oberfläche und machen dabei ca. 16% der Lungenzellen aus (Crapo et al. 1982). Sie sind deutlich kleinflächiger als Typ I Zellen, besitzen ein organellenreiches Zytoplasma und ragen mit ihrer typisch kuboidalen Morphologie in das alveolare Lumen hinein. Eine morphologische Besonderheit der Typ II Zellen sind die Lamellar bodies. Diese spezialisierten sekretorischen Organellen dienen der Bereitstellung und Sekretion von Surfactant („Surface Active Reagent“) (Andreeva et al. 2007). Pulmonaler Surfactant ist eine oberflächenaktive Substanz, welche zu 90% aus Phospholipiden und zu 10% aus Proteinen besteht. Neben immunmodulatorischen Funktionen dient Surfactant der Reduzierung der Oberflächenspannung in den Alveolen, was deren Kollabieren am Ende der Expiration verhindert (Fehrenbach 2001). Neben der Surfactantproduktion dienen Typ II ebenfalls dem Ionen- und Wassertransport sowie der Synthese immunmodulatorischer Faktoren. Außerdem können sie nach Schädigung des Alveolarepithels proliferieren und zu Typ I Zellen differenzieren. Verloren gegangene Typ I Zellen können somit ersetzt werden (Fehrenbach 2001).

Außerdem sind in den Alveolen regelmäßig Alveolarmakrophagen zu finden. Sie phagozytieren z.B. Staubpartikel und Mikroorganismen, die mit der Atemluft in die Alveolen

gelangen und haben eine Schlüsselfunktion in der Steuerung der pulmonalen Wirtsabwehr (Welsch 2010).

1.5 Akutes Atemnotsyndrom (ARDS) in der viralen Pneumonie

Das Akute Atemnotsyndrom (Acute Respiratory Distress Syndrome - ARDS) ist eine akute lebensbedrohliche Schädigung der Lunge und eine häufige Komplikation der schweren Pneumonie. Das ARDS ist mit einer hohen Mortalität assoziiert, welche schätzungsweise zwischen 26 und 58 % liegt (Estenssoro et al. 2002; Brower et al. 2004; MacCallum and Evans 2005; Rubenfeld et al. 2005; Villar et al. 2011). Neben Sepsis, bakterieller und viraler Pneumonie, welche die häufigste Ursache des ARDS darstellen, kann ein ARDS auch durch eine Vielzahl weiterer intra- und extrapulmonaler Noxen verursacht werden (Matthay et al. 2012). Zytokindysregulation, die unkontrollierte Aktivierung des Gerinnungssystems, die massive Ansammlung aktivierter Leukozyten und die Schädigung der alveolokapillären Schranke sind zentrale pathophysiologische Merkmale des ARDS (Ware and Matthay 2000; Matthay and Zimmerman 2005). Ein typischer pathohistologischer Befund des ARDS ist der diffuse Alveolarschaden (Diffuse Alveolar Damage – DAD), welcher sich durch Kapillarthrombosen, interstitielle Ödeme, inflammatorische Infiltrate, intraalveoläre Ödeme und/oder Hämorrhagien sowie die Bildung hyaliner Membranen in der Alveole auszeichnet (Castro 2006). Das ARDS ist eine häufige Komplikation bei Patienten mit primärer viraler Pneumonie, welche vor allem durch hochpathogene H5N1 Viren aber auch durch das pandemische Influenzavirus A(H1N1) 2009, das neue H7N9 Influenzavirus sowie durch SARS- und das neue MERS-CoV verursacht werden (Yu et al. 2008; Ramsey and Kumar 2011; Gao et al. 2013; Graham et al. 2013; The Who Mers-Cov Research 2013). Ein DAD ist ein typischer Befund bei Autopsiestudien fatal verlaufender Fälle von Influenzavirus- und SARS-Coronaviruspneumonien (Franks et al. 2003; Taubenberger and Morens 2008). Ein DAD entsteht durch Schädigung der Endothel- und/oder der Epithelzellen der Alveolarwand. Die Schrankenstörung der alveolokapillären Membran hat einen Austritt von Flüssigkeit, Plasmaprotein und Zellen aus den Alveolarkapillaren in die Alveole zur Folge (Lukas Bubendorf 2010). Bei der Influenzaviruspneumonie zum DAD führende Mechanismen sind bisher nur ansatzweise verstanden. Ein wichtiger Faktor scheint der Untergang alveolarepithelialer Zellen zu sein, wobei dieser vermutlich auf den direkten zytopathischen Effekt des Virus, aber auch indirekt auf die Zytokindysregulation zurückzuführen ist (Gao et al.

2013). *In vivo* und *in vitro* Untersuchungen legen nahe, dass Apoptose ein wichtiger Mechanismus des Influenzavirus-induzierten Zelltod ist (Takizawa et al. 1993; Hinshaw et al. 1994; Mori et al. 1995; Colamussi et al. 1999; Nichols et al. 2001). Die Rolle und pathologische Signifikanz der Apoptose in der Influenzavirusinfektion ist jedoch umstritten. Da der Untergang einer virusinfizierten Epithelzelle die Ausbreitung des Virus im Gewebe limitiert, gilt die Apoptose einerseits als Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität. Andererseits wurde gezeigt, dass die Aktivierung einer Protease der apoptotischen Caspase-Kaskade, der Casapse 3, für eine effiziente Influenzavirusreplikation notwendig ist (Wurzer et al. 2003). Außerdem führt der Untergang der Alveolarepithelzellen zur Schädigung der alveolaren Barriere mit konsekutiver Störung der pulmonalen Gasaustauschfunktion. Untersuchungen an *post mortem* Lungengewebe Influenzavirus-infizierter Patienten konnten Apoptose in Alveolarepithelzellen nachweisen (Uiprasertkul et al. 2007; Gao et al. 2013) und lassen vermuten, dass Apoptose ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des Virus beim Menschen darstellt.

1.6 Zielsetzung

Influenzaviren als auch das neue MERS-CoV können im Menschen zur Infektion der unteren Atemwege führen. Dies resultiert häufig in einer primären viralen Pneumonie, welche oftmals rasch in einem akuten Lungenversagen mit oft tödlichem Ausgang resultiert (Abdel-Ghafar et al. 2008; Milne-Price et al. 2014).

Während humanpathogene Influenzaviren im menschlichen Respirationstrakt effizient replizieren, ist dieses Gewebe für die meisten aviären Influenzaviren nicht permissiv. Trotzdem überwinden HPAI Viren immer wieder die aviär-humane Speziesbarriere (Claas et al. 1998; Subbarao et al. 1998; WHO 2012). Da humane Lungenepithelzellen sowohl humane als auch aviäre Influenzavirusrezeptoren exprimieren, ist die unterschiedliche Replikationsfähigkeit der Viren nicht allein durch einen unterschiedlichen Rezeptorbesatz zu erklären und vermutlich durch weitere, bisher unbekannte Faktoren bedingt. Welche Wirts- und Virusbedingten Faktoren für die unterschiedliche Replikationsfähigkeit und Pathogenität im menschlichen Wirt verantwortlich sind, ist bisher nur ansatzweise verstanden.

Es ist zudem weitestgehend ungeklärt, welches Schicksal eine Influenzavirus-infizierte Zelle im Gewebeverband erfährt, und welche Auswirkungen dies auf die Alveole hat. Autopsien

fataler H5N1 Fälle ergaben, dass es während der Influenzapneumonie zum diffusen alveolären Schaden im Lungengewebe kommt (Taubenberger and Morens 2008).

Pathomechanismen, die der MERS-CoV-Infektion zu Grunde liegen sind bislang weitgehend unbekannt. Da bis heute keine Autopsiestudien fataler MERS-CoV-Infektionen vorliegen, fehlen wegweisende Informationen zur Virus-Wirts-Interaktion in der menschlichen Lunge.

Bisherige Studien zum Infektionsverhalten respiratorischer Viren nutzen weitestgehend Tiermodelle oder immortalisierte Zelllinien, welche nicht unbedingt die Situation im Patienten widerspiegeln.

Das ständige Auftreten neuer respiratorischer Erreger in der Bevölkerung (Berry et al. 2015) zeigt, dass humanrelevante Untersuchungsmodelle zur Pneumonie von hoher medizinischer Bedeutung sind. Ziel der Arbeit war die Etablierung eines *ex vivo* Lungenkulturmodells zur Untersuchung der Influenzavirus- und der MERS-CoV-Infektion in primärem humanem Gewebe als klinisch relevante Alternative zu den genannten Modellsystemen. Das Infektionsverhalten humanpathogener, hoch- und niedrigpathogener aviärer und porciner Influenzaviren in primärem humanem Gewebe soll hinsichtlich des Zelltropismus und der Replikationsfähigkeit systematisch verglichen werden. MERS-CoV-infiziertes Gewebe soll ebenfalls hinsichtlich des viralen Replikationsvermögens, des Zelltropismus und des ausgelösten alveolaren Schadens untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Anbieter</i>
LSM 5	Zeiss
LSM 780	Zeiss
Dampfgarer MultiGourmet	BRAUN
Gewebeeinbettungsautomat	Pathcentre
Kreisschüttler GFL 3005	GFL
Magnetrührer VARIMAG	MONOTHERM
Konfokalmikroskop	Zeiss
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Schlittenmikrotom	Fa. Jung
Tischzentrifuge Biofugefresco	Hereus
Trockenschrank	Memmert
Tisch-Ultrazentrifuge TL100 (mit TLA-55 Rotor)	Beckman Instruments
Vortex 2 Genie	Scientific Industries, Biochema
Waage 440-33	KERN
Peltier Thermal Cycler (PTC-200)	MJ Research
NanoDrop2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific
FastPrep®-24 Gewebekomogenisator	MP Biomedicals

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Anbieter</i>
Biopsie-Stanzen (8mm)	pfm
Objektträger	SuperFrost®

Skalpell	FEATHER®
Zellkulturplatten (diverse Ausführungen)	Falcon
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Falcon
PBS	PAA
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Anbieter</i>
Avicel	FMC
Bovine Serum Albumin 30% Solution, sterile	Gentaur
Bovines Serum Albumin, Fraction V, > 96%	Sigma-Aldrich
Caspase Inhibitor I (Z-VAD)	Calbiochem
Clarion	Biomeda
DAPI	Calbiochem
DMEM (TS) High Glucose (4,5 g/l)	PAA
Dulbecco's PBS (1x)	PAA
Ethanol, 99%	CG-Chemikalien, Laatzen
FCS (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA
Formaldehydlösung (37%)	Sigma-Aldrich
Glutamin (GlutaMax™-I)	GIBCO
GlycoBlue	Life Technologies
Kristallviolett	Merck
Methylgrün, Zinkchloridsalz	Sigma-Aldrich
Mowiol 4-88	Roth
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Roth
NaCl	Merck
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Merck
Penicillin/Streptomycin	BIOCHROM AG
Roticlear	Roth

Staurosporin, <i>Streptomyces sp.</i>	Merck
Z-VAD-FMK	Calbiochem

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,01 M PBS Waschpuffer	0,001M Na ₂ HPO ₄ , 0,001M NaH ₂ PO ₄ , 0,15M NaCl, pH 7,6
Citrat-Puffer	0,01 M Natriumcitratdihydrat, pH 6,0
Formaldehyd-Fixierlösung	4% Formaldehyd in PBS (v/v)
Paraformaldehyd (PFA)-Fixierlösung	3% PFA in PBS (w/v)
Kristallviolett-Formaldehyd-Lösung	Kristallviolett-Lösung (20% (v/v) Ethanol, 1% (w/v) Kristallviolett in Aqua dest.) Formaldehyd-Lösung (10% (v/v) 37%ige Formaldehyd-Lösung in Aqua dest.) Kristallviolett-Lösung + Formaldehyd-Lösung (1:10)
Methylgrün-Färbelösung	0,8% Methylgrün (w/v), 20% Ethanol (v/v)
Pronase-Reaktionspuffer	0,1 % CaCl ₂ (w/v), 0,1M Tris, pH 7,8
Tris-EDTA-Puffer	10 mM Tris Base, 1 mM EDTA Solution, pH 9,0
Verdünnungsmedium	0,01M PBS, 1% BSA (w/v); 0,05% Tween 20 (v/v)
DAPI-Lösung	3 µM in H ₂ O
1%ige Hühnererythrozyten-Suspension	1% (v/v) Hühnererythrozyten in 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung

2.1.5 Medien und Zusätze

Tabelle 6: Medien und Zusätze für MDCK Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Kultivierungsmedium		

Materialien und Methoden

MEM (Minimal Essential Medium)	500 ml	PAA
FCS	10% (v/v)	Gibco
Glutamin	1% (v/v)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)	BIOCHROM AG
Avicel Überschichtungsmedium (10 ml)		
Avicel Stocklösung, 2,5% (w/v) in Aquabidest., autoklaviert	4,86 ml	FMC
2x konzentriertes MEM Medium, autoklaviert	4,86 ml	GIBCO
BSA 30% (w/v) Solution, sterile	66,7 µl	GENTAUR
NaHCO ₃ Stocklösung, 5% (w/v) in Aqua bidest., sterilfiltriert	100 µl	MERCK
DEAE-Dextran Lösung, 1% (w/v) in Aqua bidest., sterilfiltriert	100 µl	SIGMA
TPCK Trypsin Stock (1 mg/ml)	10 µl	SIGMA
PBS⁺⁺		
PBS Dulbecco w Ca ²⁺ , w Mg ²⁺	500 ml	BIOCHROM AG
BSA 30% (w/v) Solution, sterile	1% (v/v)	GENTAUR

Tabelle 7: Medien und Zusätze für A549 Zellen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Hersteller</i>
Kultivierungsmedium		
DMEM-High Glucose	500 ml	PAA
FCS	10% (v/v)	Gibco
Glutamin	1% (v/v)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)	BIOCHROM AG
Infektionsmedium		

Materialien und Methoden

DMEM-High Glucose	500 ml	PAA
BSA 30% (w/v) Solution, sterile	1% (v/v)	Gibco
Glutamin	1% (v/v)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)	BIOCHROM AG

Tabelle 8: Medien und Zusätze für die Kultivierung von humanem Lungengewebe

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Hersteller</i>
Kultivierungs- und Infektionsmedium		
RPMI-1640	500 ml	Gibco
BSA 30% (w/v) Solution, steril	1% (v/v)	Gibco
Glutamin	1% (v/v)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)	BIOCHROM AG

2.1.6 Enzyme

Tabelle 9: Enzyme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Produktnr.:</i>	<i>Hersteller</i>
Neuraminidase	P0720S	NEB
Pronase	10165921001	Roche
TPCK Trypsin	T1426	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA (1x)	L11-004	PAA

2.1.7 Antikörper, Seren und Lektine

Tabelle 10: Primärantikörper, Seren und Lektine

<i>Primärantikörper [Spezies]</i>	<i>Produktnr.:</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Influenza A [Ziege]	OBT1551	Serotec
Anti-Cleaved Caspase 3 (Asp175) [Kaninchen]	9661	Cell Signaling

Anti-human Caveolin 1 [Kaninchen]	sc-894	Santa Cruz
Anti-human CD68 [Maus]	ab955-500	Abcam
Anti-human Epithelial Membrane Protein 2 (EMP2) [Kaninchen]	HPA014711	SIGMA
Anti-pan-Cytokeratin [Maus]	sc-8018	Santa Cruz
Anti-von Willebrand Faktor [Maus]	sc-73268	Santa Cruz
Anti-Prosurfactant Protein C (proSP-C) [Kaninchen]	AB3786	Millipore
Ziegenserum	G9023-5ml	SIGMA
<i>Maackia amurensis</i> lectin (MAA), AP-konjugiert	LA-7801-1	EY Laboratories
<i>Sambucus nigra</i> lectin (SNA) I, AP-konjugiert	LA-6802-1	EY Laboratories

Tabelle 11: Sekundärantikörper

<i>Sekundärantikörper [Spezies]</i>	<i>Produktnr.:</i>	<i>Hersteller</i>
Alexa 488 Anti-mouse [Ziege]	A11017	invitrogen
Alexa 488 Anti-rabbit [Ziege]	A11070	invitrogen
Alexa 546 Anti-mouse [Kaninchen]	A11060	MolecularProbes
Alexa 555 Anti-mouse [Ziege]	A21127	MolecularProbes
Alexa 594 Anti-mouse [Ziege]	A11005	invitrogen
Alexa 555 Anti-rabbit [Ziege]	A21429	MolecularProbes
Alexa 488 Anti-human [Ziege]	A-11013	Life Technologies

2.1.8 Reaktionssysteme und Kits

Tabelle 12: Reaktionssysteme und Kits

<i>Kit</i>	<i>Produktnr.:</i>	<i>Hertseller</i>
DyLight 488 Microscale Antibody Labeling Kit	53025	Thermo Scientific
POWER SYBER Green	4367659	Applied Biosystems

Carbo-Free™ Blocking Solution (10xKonzentrat)	SP-5040	Vector Laboratories
DyLight 594 Microscale Antibody Labeling Kit	53045	Thermo Scientific
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368813	Applied Biosystems
Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I	SK-5100	Vector Laboratories
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	11644793001	Roche

2.1.9 Primer

Tabelle 13: Primer - Real-Time PCR

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Hersteller</i>
M (Pan & D/Alb) (for)	5' –GACCAATCCTGTCACCTCTGA–3'	Metabion
M (Pan & D/Alb) (rev)	5' –GCATTTTGGACAAAGCGTCT–3'	Metabion
PB2 (Pan & D/Alb) (for)	5' –CTAATGTGCTAATTGGGCAAGG–3'	Metabion
PB2 (Pan & D/Alb) (rev)	5' –CGAATTCTTTTGGTCGCTGT–3'	Metabion
PB1 (Pan & D/Alb) (for)	5' –TATCGCTATGGATTTGTGGC–3'	Metabion
PB1 (Pan & D/Alb) (rev)	5' –CTCCAATGCTCATATCAGCTG–3'	Metabion

Tabelle 14: Primer - Reverse Transkription

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>
Uni-A (Influenza A) (for)	5' –AGCAAAAGCAGG–3'
Uni-G (Influenza A) (rev)	5' –AGCGAAAGCAGG–3'

2.1.10 Plasmide

Tabelle 15: Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>vom RNA-Genomsegment kodierte Proteine</i>	<i>Größe [bp]</i>
pHW2000-A/Panama/2007/1999-M	Matrixprotein	5385

pHW2000-A/Panama/2007/1999-PB1	Polymerase Basic Protein 1	5333
pHW2000-A/Panama/2007/1999-PB2	Polymerase Basic Protein 2	5299

2.1.11 Stimulanzen und Inhibitoren

Tabelle 16: Stimulanzen und Inhibitoren

<i>Bezeichnung</i>	<i>Produktnr.:</i>	<i>Hersteller</i>
Staurosporine, <i>Streptomyces</i> sp.	569397	Merck
Caspase Inhibitor I (Z-VAD)	627610	Calbiochem

2.1.12 Virusstämme

Tabelle 17: Virusstämme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Subtyp</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Eigenschaft</i>
A/Panama/2007/1999	H3N2	Pan/99/(H3N2)	saisonales Influenzavirus
A/New Caledonia/20/1999	H1N1	NC/99(H1N1)	saisonales Influenzavirus
A/Bayern/63/2009	H1N1	Bay/09(H1N1pdm)	pandemisches A(H1N1) 2009 Influenzavirus
A/Thailand/1(Kan-1)/2004	H5N1	Thai/04(H5N1)	hoch-pathogenes aviäres Influenzavirus
A/Duck/Alberta/60/1976	H12N5	Dk/Alb(H12N5)	niedrig-pathogenes aviäres Influenzavirus
A/Swine/Wisconsin/1/1967	H1N1	Sw/Wis(H1N1)	klassisches porcines Influenzavirus
1918HA/NA x A/New Caledonia/20/1999	H1N1	1918xNC(H1N1)	1918-HA/NA Influenzavirus Reassortante
A/Puerto Rico/8/34 (NS1-GFP)	H1N1	PR8 NS1-GFP(H1N1)	attenuierter Laborstamm
A/Anhui/1/2013	H7N9	Anh/13(H7N9)	neues niedrig-pathogenes

			Influenzavirus
A/Turkey/Italy/472/99	H7N1	Trk/It(H7N1)	niedrig-pathogenes aviäres Influenzavirus
A/Turkey/Germany/R11/01	H7N7	Trk/Ger(H7N7)	niedrig-pathogenes aviäres Influenzavirus
Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus		MERS-CoV	

Alle genannten Influenzavirusstämme wurden freundlicherweise von Dr. Thorsten Wolff (RKI, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht des Dk/Alb(H12N5)- und des Sw/Wis(H1N1)-Stocks erfolgte auf embryonierten Hühnereiern und die des PR8 NS1-GFP(H1N1)-Stocks auf Vero Zellen (RKI). Alle anderen Virusstock wurden auf MDCK Zellen angezogen. Das MERS-CoV wurde durch Prof. Dr. Ron Fouchier (Erasmus Medical Center Rotterdam) zur Verfügung gestellt.

2.1.13 humane Lungengewebeproben

Tumorfremde humane Lungengewebeproben stammten aus Tumorresektionen der Thoraxchirurgien des Helios Klinikums Emil von Behring (Berlin, Zehlendorf), des DRK Klinikums Mitte (Berlin, Mitte) und der Charité (Berlin, Campus Mitte). Alle Patienten wurden mündlich und schriftlich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der entnommenen Lungengewebeprobe für diese Studie (Projekt EA2/050/08 und EA2/023/07), welche durch das Ethikkomitee der Charité genehmigt wurde. Die Gewebeproben wurden direkt aus dem Operationssaal oder aus der Schnellschnittdiagnostik auf Eis in sterilem Zellkulturmedium (RPMI, ohne Zusätze) per Bote verschickt und konnten somit innerhalb von 2-3 Stunden nach operativer Entfernung für die Studie verwendet werden.

2.1.14 Zytospins einer bronchoalveoläre Lavage (BAL) eines MERS-CoV-infizierten Patienten

Zytospins einer BAL eines MERS-CoV infizierten Patienten wurde von Prof. Dr. Christian Drosten (Universität Bonn) und dem Klinikum der Universität München zur Verfügung

gestellt. Die BAL-Zytospins wurden mit Aceton auf Eis fixiert und bis zur Immunfärbung bei -20°C gelagert.

2.1.15 Zelllinien

2.1.15.1 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)-Zelllinie

Bei MDCK-Zellen handelt es sich um Nierenepithelzellen eines gesunden Hundes (Madin and Darby 1958). Diese Zelllinie lässt sich gut von Influenzaviren infizieren und wird in der Regel für den Influenzavirusplaque-Assay verwendet. Die Zellen wurden für den Plaque-Assay bis Passage 40 benutzt.

2.1.15.2 A549 Zelllinie

Bei A549 Zellen handelt es sich um humane alveoläre Basalepithelzellen eines Adenokarzinoms, welche 1972 aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen Mannes gewonnen wurden (Giard et al. 1973). Die A549-Zellen wurden bis Passage 32 verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (Laminar-Flow). Die Zellen wurden in einem CO₂-begasten Brutschrank (5% CO₂) bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die Cryoröhrchen wurden sofort nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in 10 ml entsprechendem Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden dann für 5 Min bei 172 g sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Zellkulturmedium.

2.2.1.2 Anlegen von Cryostocks

Aus einer 75 cm² Zellkulturflasche wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) bedeckt, ca. 2 Min bei 37°C inkubiert und durch Spülen mit der Pipette vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Dann wurden 8 ml vorgewärmtes Medium hinzugesetzt, wobei die Zellen durch Spülen mit der Pipette vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und gleichmäßig resuspendiert wurden. Es folgte die Sedimentierung der Zellen bei 172 g für 5 Min. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 3 ml Einfriermedium (10% (v/v) DMSO in entsprechendem Medium) resuspendiert. Die Cryoröhrchen wurden mit je 1 ml Zellsuspension befüllt, in einer mit Isopropanol befüllten Box mindestens 24 h bei -80°C gelagert und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.3 Kultivieren und Passagieren von A549 Zellen

Die Kultivierung der A549 Zellen erfolgte in 10 ml DMEM-High Glucose Medium (10% (v/v) FCS, (v/v) 1% Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) in 75 cm² Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie einen konfluenten Monolayer ausbildeten. Dafür wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) bedeckt und ca. 2 Min bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 8 ml Medium, wobei die Zellen durch Spülen mit der Pipette vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und gleichmäßig resuspendiert wurden. Ein Drittel des Volumens der Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung in eine neue Zellkulturflasche überführt, welche mit frischem Medium zu einem Endvolumen von 10 ml aufgefüllt wurde.

2.2.1.4 Stimulation von A549 Zellen

A549 Zellen wurden 24 h vor Gebrauch in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät. Dabei wurden pro Vertiefung 400 µl Zellsuspension einer konfluenten 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und 600 µl frisches DMEM-High Glucose Medium (10% (v/v) FCS, (v/v) 1% Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) hinzugegeben.

Für die Stimulation wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen. Nach 2 Waschschritten mit PBS erfolgte die Zugabe von 200 µl einer in Infektionsmedium (DMEM-High Glucose Medium (0,3% (w/v) BSA, (v/v) 1% Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin))

entsprechend verdünnten Virussuspension auf die Zellen, welche daraufhin 45 Min bei RT inkubiert wurden. Die Zellkulturplatte wurde dabei alle 10 Min leicht geschwenkt. Anschließend wurde die Virussuspension entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und je 1 ml Infektionsmedium auf die Zellen gegeben. Es folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.1.5 Kultivierung und Passagieren von MDCK Zellen

Die Kultivierung der MDCK Zellen erfolgte in 10 ml MEM Medium (10% (v/v) FCS, (v/v) 1% Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) in 75 cm² Zellkulturflaschen. Die Passagierung der Zellen fand jeweils montags und freitags statt. Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes folgte ein Waschschrift mit 15 ml PBS. Anschließend wurde 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) auf die Zellen gegeben, welches nach kurzem Durchschwenken der Zellkulturflasche wieder abgenommen wurde. Nach erneuter Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubierten die Zellen für ca. 15 Min bei 37°C. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte durch Spülen mit der Pipette. Es wurden 8 ml Medium hinzugesetzt, wobei die Zellen mit der Pipette gleichmäßig resuspendiert wurden. Montags wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:12 und freitags in einem Verhältnis 1:10 in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.2.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden zunächst, wie bei der Kultivierung und dem Passagieren der entsprechenden Zelllinie beschrieben, vom Boden der Zellkulturflasche oder der Zellkulturplatte abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 µl der Zellsuspension auf die Neubauer-Zählkammer erfolgte die Zellzählung unter dem Mikroskop. Dabei wurden 2 Quadrate, bestehend aus jeweils 16 Kleinquadraten, ausgezählt. Die Zellzahl wurde wie folgt ermittelt:

$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl aus 2 Quadraten} / 2 \times 10^4 \text{ (Kammerkonstante)}$
--

2.2.1.7 Vorbereitung humaner Lungengewebeproben

Tumorfrees Lungengewebe wurde zunächst mit Hilfe eines Skalpells in einer Petrischale auf Eis in sehr dünne Scheiben geschnitten, aus denen dann mittels Biopsie-Stanzen ca. 3 mm

dicke Zylinder mit einem Durchmesser von 8 mm gestanzt wurden. Die so gewonnenen Gewebeproben wurden für 10 Min in 50 ml eiskaltem RPMI Medium (blank) ausgewaschen und dann jeweils in 1,5 ml RPMI Infektions- und Kultivierungsmedium in 24-Wellplatten eingewogen, wobei das Gewicht der Proben im Mittel bei 110 mg lag. Die Gewebeproben wurden vor der Stimulation versuchsabhängig entweder 1h oder über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.8 Stimulation humaner Lungengewebeproben

Infektion mit Influenzaviren

Zur Infektion wurden die Lungengewebeproben auf einem sterilen Tupfer kurz trocken getupft und dann in das 1x10⁶ oder 5x10⁶ Plaque Forming Units (pfu) in 500 µl RPMI Infektions- und Kultivierungsmedium enthaltende Well gegeben. Die infizierten Proben wurden dann 24h bzw. 48h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Infektion mit MERS-CoV

Die Infektion von Lungengewebeproben mit MERS-CoV erfolgte in gleicher Weise wie die Infektion mit Influenzaviren. Alle Infektionen wurden von Jessica von Recum (RKI) im BSL3-Labor durchgeführt.

Stimulation mit Staurosporin und Caspase Inhibitor I (Z-VAD-FMK)

Die Lungengewebeproben wurden vor der Stimulation 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 1 h vor der Stimulation mit Staurosporin erfolgte die Zugabe des Pan-Caspase Inhibitors Z-VAD in 1,5 ml RPMI Medium der entsprechenden Lungengewebeprobe (Endkonzentration: 50 µg/ml). Das Medium wurde mit der Pipette gut durchmischt und es wurden 100 µl des Mediums mit einer Spritze in die Gewebeprobe eingebracht. Nach erneuter Inkubation für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Stimulation der Gewebeprobe mit Staurosporin. Dafür wurde das Staurosporin ebenfalls zunächst in die 1,5 ml RPMI Medium der entsprechenden Lungengewebeprobe gegeben (Endkonzentration: 4 µM) und wie für den Pan-Caspase Inhibitors Z-VAD beschrieben in die Gewebeprobe eingebracht. Die Inkubation der Gewebeprobe erfolgte für 24 h bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.2 Immunhistochemie und Lektinhistochemie

2.2.2.1 Probengewinnung

Die Gewebeproben wurden in Gewebekapseln überführt und in neutral gepuffertem 4%igem Formaldehyd fixiert, wobei die Fixierdauer 12-72 h betrug. Anschließend erfolgte die automatische Paraffineinbettung (durchgeführt durch die AG Gruber am Institut für Tierpathologie der freien Universität Berlin), bei der die Gewebekapseln sukzessiv in den unten genannten Reagenzien verblieben (Tabelle 18). Eine aufsteigende Alkoholreihe entwässerte das Gewebe, worauf die Paraffineinbettung folgte. Die Gewebeproben wurden schließlich in Metallkapseln überführt, welche mit flüssigem Paraffin ausgegossen wurden. Nach Erkalten bei 4°C wurden die Paraffinblöcke von den Metallkapseln abgelöst und bei RT gelagert.

Tabelle 18: Automatische Paraffineinbettung der Gewebeproben

<i>Reagenz</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
10%iges Formalin	1 h	
Leitungswasser	45'	
70%iges Ethanol	45'	
85%iges Ethanol	45'	
96%iges Ethanol	45'	2
Isopropanol	1 h	2
Essigsäure-n-Butylester	1 h	2
Paraplast Plus	1 h (60°C)	4

Mit einem Schlittenmikrotom wurden ca. 10 µm dicke Schnitte angefertigt, welche dann auf Objektträger aufgetragen, luftgetrocknet und für 1h im Brutschrank bei 60°C nachgetrocknet wurden.

2.2.2.2 Fluoreszenzmarkierung des Influenza A Antikörpers

Die Markierung des Influenza A Antikörpers (Serotec) wurde mit Hilfe des DyLight™ Microscale Antibody Labeling Kits durchgeführt. Es wurden zunächst 100 µl Antikörperversdünung in PBS-Boratpuffer hergestellt (Endkonzentrationen: 0,05 M Borat, 1 mg/ml Antikörper). In dieser Antikörperversdünung wurde dann der lyophilisierte Farbstoff (Alexa Fluor 488/594) im DyLight Reagenzgefäß gelöst und gut durchmischt. Das Farbstoff-Antikörper-Gemisch inkubierte 1 h bei RT im Dunkeln. 100 µl des Aufreinigungsgranulats wurden in die Aufreinigungssäulchen gegeben und bei RT für 45 Sec bei 1000 g zentrifugiert.

Der Durchlauf wurde entsorgt und das Säulchen in ein frisches Gefäß gesetzt. Nun wurden die 100 µl des Farbstoff-Antikörper-Gemisches auf das Säulchen gegeben und gut mit dem Aufreinigungsgranulat vermischt. Das Säulchen wurde erneut bei RT für 45 Sec bei 1000 g zentrifugiert, wobei der Durchlauf den primär markierten Antikörper enthielt. Die Aufbewahrung des Antikörpers fand entweder 2 Wochen bei 4°C im Dunkeln oder aliquotiert bei -20°C statt.

2.2.2.3 Durchführung der Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte wurden zunächst in Roticlear entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tabelle 19).

Tabelle 19: Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte

<i>Reagenz</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
Roticlear	15' (60°C)	3
100%iges Ethanol	15'	
100%iges Ethanol	1'	
96%iges Ethanol	10'	
80%iges Ethanol	5'	
70%iges Ethanol	5'	
50%iges Ethanol	5'	
PBS	5' (auf dem Schüttler 100 U/min)	3

Antigenabhängig erfolgte nun eine entsprechende Methode zur Epitopdemaskierung (Tabelle 20), welche die durch die Formalinfixierung verdeckten Antigene freilegt und somit deren Detektion durch spezifische Antikörper ermöglicht. Dafür wurden die Gewebeschnitte in Citrat-Puffer bzw. in Tris-EDTA Puffer 30 Min im Dampfkochgarer gekocht. Nach dem Erkalten auf RT wurden die Gewebeschnitte in PBS überführt und 3 x 5 Min in PBS auf dem Schüttler (100 U/min) gewaschen. Alternativ wurde zur Epitopdemaskierung ein Pronaseverdau durchgeführt. Nach Zugabe von jeweils 70 µl Pronaselösung (0,5 mg/ml Pronase in Pronase-Reaktionspuffer) zum Gewebeschnitt folgte eine Inkubation in der feuchten Kammer für 4 Min bei 37°C. Die Gewebeschnitte wurden dann wie oben beschrieben 3 x 5 Min in PBS gewaschen.

Tabelle 20: Epitopdemaskierung

<i>Antikörper</i>	<i>Epitopdemaskierung</i>		
	<i>Kochen (CitratPuffer)</i>	<i>Kochen (Tris-EDTA Puffer)</i>	<i>Pronase</i>
Anti-Influenza A	ja	ja	ja
Anti-Cleaved Caspase 3	nein	ja	nein
Anti-human Caveolin 1	ja	/	/
Anti-human CD68	ja	ja	/
Anti-human EMP2	ja	ja	/
Anti-proSP-C	ja	/	ja
Anti-pan-Cytokeratin	/	ja	/
Anti-von Willebrand Faktor	/	ja	/
MERS-CoV Patientenserum	ja	ja	/

Zur Detektion zytoplasmatischer Targets erfolgte nun die Permeabilisierung der Gewebeschnitte. Diese wurden 15 Min in 1%igem Triton (in PBS) auf dem Schüttler (100 U/min) inkubiert und anschließend wie oben beschrieben 3x 5 Min in PBS gewaschen.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit entsprechendem 5%igem Serum in Verdünnungsmedium 30 Min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Nach einmaligem Abspülen mit PBS wurden die Schnitte nun mit dem in Verdünnungsmedium entsprechend verdünnten primären Antikörper (Tabelle 21) über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nachdem die Schnitte wie oben beschrieben 3x 5 Min in PBS gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation des in Verdünnungsmedium verdünnten sekundären Antikörpers (1:2000) für 2h bei RT in der feuchten Kammer. Die Schnitte wurden erneut wie oben beschrieben 3 x 5 Min in PBS gewaschen.

Tabelle 21: eingesetzte Primärantikörperverdünnungen

<i>Primäre Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
Anti-Influenza A (<i>primär markiert</i>)	1:30
Anti-Cleaved Caspase 3 (Asp175)	1:500
Anti-human Caveolin 1	1:400
Anti-human CD68	1:50
Anti-human Epithelial Membrane Protein 2 (EMP2)	1:50
Anti-Nucleoprotein (Influenza A)	1:100
Anti-Prosurfactant Protein C (proSP-C)	1:800
Anti-pan-Cytokeratin	1:100
Anti-von Willebrand Faktor	1:800
MERS-CoV Patientenserum	1:1000

Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte mit DAPI-Lösung 5 Min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert und erneut wie oben beschrieben 3 x 5 Min in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Mowiol eingedeckelt, mit Nagellack versiegelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Für die Hellfeldmikroskopie erfolgte die Detektion des primären Antikörpers mittels mit alkalischer Phosphatase markierten sekundären Antikörpern. Zur Visualisierung diente die Inkubation mit Vector® Red Reagenz. Die darin enthaltene organische Phosphatverbindung wird durch die alkalische Phosphatase zu einem sichtbaren roten Endprodukt umgesetzt. Die Kerne wurden mit Hämalun gegengefärbt und nach einer kurzen aufsteigenden Alkoholreihe in Roticlear überführt (Tabelle 22) und mit dem permanenten Eindeckmedium Clarion eingedeckelt. HE-Färbungen wurden von der AG Gruber am Institut für Tierpathologie der freien Universität Berlin durchgeführt.

Tabelle 22: Hämalunfärbung und Entwässerung der Gewebeschnitte

Reagenz	Zeit	Wiederholungen
Hämalunlösung	10'	
Aquadest	2x abspülen	
Leitungswasser (fließend)	5' wässern	
70%iges Ethanol	2'	
100%iges Ethanol	1'	
Roticlear	5'	
Roticlear	10'	

2.2.2.4 Durchführung der Lektinhistochemie

Zur Detektion von α -2,6- und α -2,3-gebundenen Sialinsäuren im humanen Lungengewebe wurden zwei Lektine, das *Sambucus Nigra* Agglutinin (SNA) bzw. das *Maackia Amurensis* Agglutinin (MAA), welche mit Alkalischer Phosphatase gelabelt waren, verwendet. Lektine sind Proteine nicht-immunogener Herkunft, welche spezifisch Kohlehydratstrukturen binden und präzipitieren. Die Gewebeschnitte wurden zunächst in Roticlear entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tabelle 19). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit der Carbo-Free™ Blocking Solution 30 Min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Nach einmaligem Abspülen mit PBS wurden die Schnitte dann mit SNA-AP bzw. MAA-AP (1:500 in PBS) 1h bei RT in der feuchten Kammer

inkubiert. Es folgte Waschschritte in PBS (3 x 5 Min). Um die Bindung der Lektine nachzuweisen, wurde das VECTOR® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I verwendet. Die VECTOR® Red Substrat Lösung wurde kurz vor Gebrauch nach den Angaben des Herstellers angesetzt und 30 Min auf den Gewebeschnitten bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden 3x 5 Min in PBS gewaschen, 5 Min bei RT mit Methylgrün gegengefärbt, dann über eine kurze aufsteigende Alkoholreihe in Roticlear überführt (Tabelle 23) und mit dem permanenten Eindeckmedium Clarion eingedeckelt.

Tabelle 23: Methylgrünfärbung und Entwässerung der Gewebeschnitte

<i>Reagenz</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
Methylgrün-Färbelösung	5'	
Aquadest	1x abspülen	
70%iges Ethanol	2'	
100%iges Ethanol	1'	
Roticlear	5'	
Roticlear	10'	

Schließlich wurden die Schnitte 24h bei 60°C getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

Neuraminidaseverdau

Um die Spezifität der Lektinbindung zu zeigen, wurden Gewebeschnitte nach der oben beschriebenen Entparaffinierung und Rehydrierung (Tabelle 19) mit Neuraminidase vorbehandelt, welche spezifisch endständige α -2,6- und α -2,3-gebundene Sialinsäuren entfernt. Die Gewebeschnitte wurden dafür mit 12,5 U/ μ l Neuraminidase in Neuraminidase Reaktionspuffer (50 mM Natriumcitrat, pH 6,0) oder mit PBS (negativ Kontrolle) für 24h bei 37°C in einer luftdicht abgeschlossenen feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden 3 x 5 Min in PBS gewaschen. Die Lektinfärbung erfolgte wie oben beschrieben. Um die Bindung der Lektine nachzuweisen, wurde das Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I wie oben beschrieben verwendet. Nach Gegenfärbung mit DAPI-Lösung folgte die Eingedeckelung der Gewebeschnitte mit Mowiol.

Durchführung der Immun-Lektindoppelfärbung

Für die Doppelfärbung der Influenzarezeptoren mit spezifischen Zellmarkern wurden uninfizierte Gewebeschnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 15). Nach 15 minütiger Permeabilisierung mit 1%gem Triton (in PBS) wurden die

Schnitte wie oben beschrieben mit Carbo-FreeTM Blocking Solution geblockt und mit SNA-AP bzw. MAA-AP inkubiert. Die Schnitte wurden 3 x 5 Min in PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit Anti-Caveolin 1 bzw. Anti-proSP-C inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 5 Min in PBS) inkubierten die Schnitte über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpern (1:2000). Es wurde mit DAPI-Lösung gegengefärbt und mit Mowiol eingedeckelt. Die Schnitte wurden mit Hilfe des Laser Scanning Mikroskopes LSM 780 unter Ausnutzung der fluoreszierenden Eigenschaften des VECTOR®Red Substrates analysiert

2.2.2.5 Immunfärbung von Zytospins (BAL)

Die Zellen wurden zunächst in 3%iger PFA-Lösung für 5 min fixiert. Dann erfolgte die Inkubation mit MERS-CoV Patientenserum (1:500 in Verdünnungsmedium) und DAPI-Lösung jeweils für 1 h bei RT. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Alexa 488-konjugiertem sekundären Antikörper (1:2000 in Verdünnungsmedium) ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert. In gleicher Weise erfolgte dann eine Doppel- oder Dreifachfärbung mit Antikörpern gegen spezifische Zellmarker. Dafür wurden ein Anti-pan-Cytokeratin (1:50), ein Anti-proSP-C (1:1000) und ein Anti-CD45 Antikörper (1:100) verwendet. Danach wurde ebenfalls jeweils mit einem korrespondierenden sekundären Antikörper (Alexa 546- oder 594-konjugiertem Anti-mouse oder Anti-rabbit Antikörper) inkubiert.

2.2.2.6 Mikroskopische Auswertung

Alle Bilder wurden mit dem LSM 780 oder dem LSM 5 Pascal Konfokalmikroskop aufgenommen. Folgende Objektive fanden Verwendung: Plan-Neofluar, 40x, NA 1.3 und Plan-Apochromat, 63x, NA 1.4, Zeiss, Jena, Germany.

2.2.2.7 Mikroskopische Auswertung

Alle Bilder wurden mit dem LSM 780 oder dem LSM 5 Pascal Konfokalmikroskop (Zeiss) aufgenommen, wobei folgende Objektive verwendet wurden: Plan-Neofluar, 40x, NA 1.3 und Plan-Apochromat, 63x, NA 1.4, Zeiss, Jena, Germany). Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Fluorochrome im Gewebe mit Licht einer Wellenlänge angeregt und emittieren daraufhin Licht einer höheren Wellenlänge, welches detektiert wird. Da Gewebepäparate jedoch einige µm dick sind, wird Licht nicht nur aus der Fokusebene, sondern aus mehreren darüber und darunter liegenden optischen Ebenen emittiert. Das resultierende Bild ergibt sich daher aus einer Überlagerung scharfer Punkte im Fokus und unscharfer Punkte außerhalb der

Fokusebene. Bei der konfokalen Mikroskopie passiert das vom Präparat ausgehende Licht jedoch eine Lochblende, welche konfokal zur Fokusebene angeordnet ist. Diese blendet das Licht außerhalb der Fokusebene aus. Dadurch wird nur das Licht nur einer optischen Ebene abgebildet, was zu einer höheren Auflösung führt.

2.2.2.7.1 Spektrales Entmischen

Menschliches Lungengewebe weist aufgrund des hohen Anteils kollagener Fasern sehr starke Autofluoreszenzsignale auf. Diese erstrecken sich zudem über das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts (mikroskopischer Messbereich ca. 400 – 700 nm) und überlagern die Spektren eingesetzter Fluorochrome wie beispielsweise DAPI, Alexa 488 oder 594. Daraus ergibt sich die Problematik, dass Immunfluoreszenzsignale unterhalb der Intensität der Autofluoreszenz strukturell nicht sicher zugeordnet werden können. Diese gehen demnach verloren und lediglich Signale oberhalb des Intensitätsniveaus der Autofluoreszenz (Intensitätsschwellenwert) können als spezifisch dargestellt werden. Somit bestehen erhebliche Einschränkungen für eine zuverlässige Mehrkanal-Immunfluoreszenz an humanem Lungengewebe. Aus diesem Grund wurde ein spezielles mikroskopisch-mathematisches Verfahren an humanem Lungengewebe eingesetzt, welches als „Spectral Imaging and Linear Unmixing“ (im Weiteren als „spektrale Mikroskopie“ benannt) bezeichnet wird. Bei der spektralen Mikroskopie wird das emittierte Licht mit Hilfe eines Prismas in das gesamte Wellenlängenspektrum aufgesplittet und über einen 32-Kanal Spektraldetektor ca. 9 nm breiten Bildkanälen (λ -Kanäle) zugeordnet. Die Intensitäten in jedem einzelnen Bildpixel pro λ -Kanal ergeben dann eine aus 32 Einzelpunkten bestehenden Spektralkurve.

Da das gemessene Gesamtspektrum in jedem Pixel in einem spektralen Bild aus den spezifischen Anteilen verschiedener Fluoreszenzen besteht (z.B. Autofluoreszenz, DAPI, Alexa 488) kann mit Hilfe eines spektralen Entmischungsalgorithmus, basierend auf zuvor gemessenen Referenzspektren, der zu erwartende Fluoreszenzanteil durch „fitting“ ermittelt werden. Somit lassen sich überlagernde Spektren in ihre jeweiligen prozentualen Anteile trennen:

$$I(\lambda) = I_1 * R_1(\lambda) + I_2 * R_2(\lambda) + \dots + I_n * R_n(\lambda)$$

Wobei $I(\lambda)$ das gemessene Spektrum, I die Intensität, $R(\lambda)$ das einzelne Referenzspektrum und n die Zahl des jeweiligen Fluorophors darstellt.

Die verschiedenen gemessenen Spektren können somit auch visuell voneinander getrennt in verschiedenen Bildkanälen farblich dargestellt bzw. eliminiert (z.B. Autofluoreszenz) werden.

2.2.2.7.2 Dreidimensionale Bildstapel und Maximumintensitätsprojektionen

Durch das schrittweise Verschieben der Fokusebene, lassen sich mehrere Einzelbilder aufnehmen, welche dann zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammengesetzt und anschließend digital verarbeitet werden. Die Einzelbilder lassen sich auch als Maximumintensitätsprojektion zusammenführen. Dabei werden die Einzelbilder übereinandergelegt, woraufhin ein zweidimensionales Bild generiert wird, welches sich aus den jeweiligen Bildpunkten mit der höchsten Intensität der Einzelbilder zusammensetzt.

2.2.2.7.3 Live-Cell-Imaging PR8 NS1-GFP (H1N1) infizierter Gewebeproben

Tumorfrees Lungengewebe wurde mit Hilfe eines Skalpells in einer Petrischale auf Eis in ca. 1 mm dünne Scheiben geschnitten, in ein mit 250 µl RPMI Infektions- und Kultivierungsmedium befülltes Well im IBIDI® Slide überführt und 1 h bei 37°C vorinkubiert. Die Gewebeprobe wurde dann auf einem sterilen Tuch trocken getupft und in ein mit PR8 NS1-GFP (H1N1) (Kuznetsova et al. 2014) Virussuspension befülltes Well gegeben. Es wurde für ca. 8 h bei 37°C inkubiert. GFP-positive Zellen wurden dann mittels Lebendgewebemikroskopie über mehrere Stunden aufgenommen.

2.2.2.8 Digitale Bildanalyse immunhistologischer Präparate

Gewebeschnitte von Influenza-infizierten, Staurosporin-behandelten sowie unbehandelten Lungengewebeproben wurden gegen Influenza A-Antigen und gegen gespaltene Caspase 3 gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Von Schnitten mit Staurosporin-behandelten und unbehandelten Gewebeproben wurden jeweils 10 Bilder pro Schnitt aufgenommen. Da bei Influenza-infizierten Gewebeproben keine gleichmäßige Verteilung sondern eher eine Clusterbildung von infizierten Zellen zu beobachten war, wurden jeweils 10 Bilder in infizierten und 10 Bilder in nicht-infizierten Arealen aufgenommen. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image-Pro Plus 7.0 wurde dann die Anzahl der Zellkerne und die Anzahl „cleaved Caspase 3“ positiver Zellen pro Bildausschnitt erfasst. Sowohl die Anzahl der

Kerne als auch die Anzahl „cleaved Caspase 3“ positiver Zellen wurde über 10 Bilder gemittelt. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ergab sich wie folgt:

$$\text{Apoptotische Zellen [\%]} = \text{Anzahl „cleaved Caspase 3“ pos. Zellen} / \text{Anzahl Kerne} \times 100$$

Als Bildausschnitte infizierter Areale wurden Bildausschnitte definiert, welche mehr als 10 Influenza A-Antigen positive Zellen enthielten. Nur diese Bildausschnitte wurden für die Berechnung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen in infizierten Arealen herangezogen.

2.2.3 Virologische Methoden

2.2.3.1 Anlegen von Virusstocks

MDCK Zellen wurden am Vortag in 75 cm² Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:3 ausgesät. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und die Zellen wurden einmal mit 15 ml PBS gewaschen. Pro Flasche wurden 1 ml Virusverdünnung in PBS⁺⁺ auf die Zellen gegeben, welches einer MOI von 0,005 entsprach. Die Flaschen wurden dann 45 Min bei RT inkubiert und alle 10 Min leicht geschwenkt, um den Flüssigkeitsfilm zu verteilen. Anschließend wurde die Virusverdünnung abgesaugt und 10 ml MEM Medium (0,3% (w/v) BSA, (v/v) 1% Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) mit Zusatz von TPCK Trypsin (Endkonzentration: 1 µg/ml) zu den Zellen gegeben. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und 5 Min bei 172 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in Cryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

2.2.3.2 Plaque-Titrations-Assay

Der Plaque-Titrations-Assay hat sich als Standardmethode zur Virustiterbestimmung etabliert, wobei die Anzahl infektiöser Viruspartikel oder pfu (Plaque Forming Units) in einer Probe ermittelt wird. Dabei wird eine susceptible Zellkultur mit unterschiedlichen Verdünnungen der zu untersuchenden Probe infiziert. Der Zellrasen wird dann mit einem viskosen Medium überschichtet, was die Diffusion der neu entstehenden Viruspartikel ins Medium verhindert. Dementsprechend wird die Infektion und damit auch die Lyse weiterer Zellen auf die unmittelbaren Nachbarzellen beschränkt. Somit führt jeder infektiöse Viruspartikel nach entsprechender Inkubationszeit zur Entstehung eines kreisförmigen, und nach entsprechender Anfärbung, makroskopisch sichtbaren Plaque im konfluenten Zellrasen.

24 h vor der Virustitration wurden 300 µl Zellsuspension einer konfluenten Flasche MDCK-Zellen, in welcher die Zellen den Tag zuvor 1:3 ausgesät worden waren, in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät, wobei pro Well 1 ml frisches Zellkulturmedium (MEM (10 % FCS, 10 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) vorgelegt wurde. Am Tag der Virustitration wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit U-förmigen Vertiefungen eine logarithmische Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 1:10) der zu testenden Virussuspension in PBS⁺⁺ (PBS, 0,90 mM CaCl₂, 2,10 mM MgCl₂, 0,2% BSA (v/v)) angelegt. Dafür wurden pro Vertiefung 180 µl PBS⁺⁺ vorgelegt und 20 µl der Virussuspension in die erste Vertiefung gegeben und resuspendiert. In dieser Weise wurden sukzessiv 20 µl auf die jeweils nächste Vertiefung übertragen. Jeweils 150 µl der Virusverdünnung wurden dann auf die zu 90% konfluenten MDCK-Zellen gegeben und 45 Min bei RT inkubiert, wobei die Zellkulturplatte alle 10 Min leicht geschwenkt wurde um das Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach entfernen der Virusverdünnung erfolgte die Überschichtung der Zellen mit Avicel-Medium, welches kurz zuvor angesetzt und erwärmt wurde. Die Zellen wurden dann 48h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, während dessen die Zellkulturplatten nicht bewegt werden durften. Nachdem Entfernen des Avicel-Mediums wurden die Zellen 2x mit je 500 µl PBS gewaschen und mit je 300 µl Kristallviolett-Formaldehyd-Lösung für 20 Min bei RT fixiert und gefärbt. Schließlich wurde die Kristallviolett-Formaldehyd-Lösung entfernt, die Anzahl der Plaques pro Vertiefung gezählt und die pfu pro ml berechnet.

2.2.3.3 Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest nutzt die Eigenschaft des Hämagglutinins auf der Oberfläche der Influenza Viren endständige Neuraminsäuren auf Erythrozyten zu binden. Bei einer ausreichend hohen Viruskonzentration führt dies zu einer makroskopisch sichtbaren Erythrozytenagglutination. Da für die Bindung der Erythrozyten lediglich das Hämagglutinin auf der Virusoberfläche vorhanden sein muss, erfasst der Hämagglutinationstest neben den infektiösen auch nicht-infektiöse Viruspartikel, welche oft bei einer fehlerhaften oder unvollständigen Verpackung segmentierter Virusgenome entstehen.

Auf einer 96-Well Mikrotiterplatte mit V-förmigen Vertiefungen wurde jeweils in die erste Vertiefung einer Längsreihe 100 µl der Virussuspension vorgelegt. In den darauf folgenden Vertiefungen wurden jeweils 50 µl PBS vorgelegt. Ausgehend von der ersten Vertiefung wurden nun sukzessiv 50 µl Virussuspension auf die jeweils nächste Vertiefung übertragen

und resuspendiert, so dass die Virussuspension schrittweise 1:2 verdünnt wurde. Aus der letzten Vertiefung wurden 50 µl verworfen. Zu den einzelnen Virusverdünnungen wurden nun jeweils 50 µl einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension gegeben und resuspendiert. Die mit Parafilm abgedeckte Mikrotiterplatte inkubierte 30 Min, wobei die Platte auf Eis stand um die Neuraminidaseaktivität zu unterdrücken. Bis zu einer bestimmten Verdünnung ist die Viruskonzentration ausreichend um die Erythrozyten zu agglutinieren, welches in der Vertiefung als gleichmäßige rötliche Schicht sichtbar wird. Ist die Viruskonzentration zu gering, sedimentieren die Erythrozyten und sind am Boden der Vertiefung als sogenannter „Knopf“ sichtbar. Der HA-Titer ergibt sich aus dem reziproken Wert der Virusverdünnung, bei der noch eine Agglutination auftritt und wird als hämagglutinierende Einheit (HAU, Haemagglutinating Unit) angegeben. Die Berechnung der hämagglutinierenden Partikel (HAP, Haemagglutinating Particle) pro ml ergibt sich wie folgt (Marcus et al. 2009):

$$\text{HA-Titer [HAP/ml]} = \text{HA-Titer [HAU/ml]} \times 5 \times 10^6 \text{ (Umrechnungsfaktor)}$$

Die Anzahl der HAP pro ml entspricht der Anzahl der physikalischen Viruspartikel pro ml.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA Isolation

RNA-Isolation aus Zelllysate

Die Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 250 µl Trizol Reagenz wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 Min bei RT lysiert. Anschließend wurde die RNA nach der beschriebenen Trizol-Methode isoliert.

RNA-Isolation aus Viruspartikeln im Zell- und Lungenkulturüberstand

750 µl Zell- bzw. Lungenkulturüberstand wurde zum Abtrennen von Zellresten 5 Min bei 172 g und bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand 90 Min bei 45000 rpm (TL100 Tischzentrifuge im TLA-55 Rotor) und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die pelletierten Viruspartikel wurden dann in Trizol aufgenommen und die RNA nach der beschriebenen Trizol-Methode isoliert.

RNA Isolation mit der Trizol-Methode

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des TRIZOL-Reagenz, basierend auf der „singlestep“ Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Das TRIZOL-Reagenz besteht aus einem Phenol-Guanidinisothiocyanat-Gemisch, welches die Zellen lysiert und gleichzeitig RNAsen inaktiviert. Zusätzlich enthält das Reagenz Phenol, in welchem sich DNA und Proteine lösen. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation kommt es zur Phasentrennung, wobei die RNA in der wässrigen Phase verbleibt, aus der sie dann mit Isopropanol gefällt werden kann.

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden mit gestopften Spitzen durchgeführt.

Die Probe wurde in 250 µl Trizol aufgenommen und mit 50 µl Chloroform versetzt. Nach 15sekündigem Schwenken erfolgte eine Inkubation für 3 Min bei RT. Der Ansatz wurde dann 10 Min bei 11000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 150 µl Isopropanol versetzt. Die Zugabe von 1 µl GlycoBlue Lösung erleichterte die spätere Sichtbarmachung des RNA-Pellets. Nachdem der Ansatz 15 Sek geschwenkt wurde, erfolgte eine Inkubation für 10 Min bei RT. Der Ansatz wurde dann 10 Min bei 11000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde mit 250 µl 75%igen (v/v) Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde erneut für 10 Min bei 11000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet für ca. 15 Min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde dann in 20 µl RNase freiem Wasser gelöst, wobei der Ansatz 5 Min bei 57°C inkubiert wurde. Die gelöste RNA wurde dann bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Reverse Transkription

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde das *High Capacityc DNA Reverse Transcription (HC-RT) Kit* verwendet.

Influenza-spezifische RT

Pro Ansatz wurden 5 µl RNA-Lösung mit 5 µl RNase freiem Wasser verdünnt und dann im Verhältnis 1:1 mit Mastermix versetzt (Tabelle 24), so dass sich für den RT-Gesamtansatz 20 µl ergaben. Für die Reverse Transkription wurden der Uni-A und der Uni-G Primer verwendet, welche komplementär zu den letzten 12 Nukleotiden am 3'-Ende der viralen RNA-

Genomsegmente sind. Dieser nicht kodierende Bereich (NCR, non-coding region) ist zwischen den verschiedenen Influenza A Viren hoch konserviert (Desselberger et al. 1980). Demensprechend wurde ausschließlich virale RNA in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 24: HC-RT Ansatz für Influenza A-spezifische RT

<i>Menge (gesamt)</i>	<i>Menge</i>	<i>Bezeichnung</i>
10 µl		Mastermix
+	5,2 µl	RNAse freies Wasser
	2,0 µl	10xRT-Puffer
	0,8 µl	25x dNTPMix
	0,5 µl	Uni-A Primer (1 µM)
	0,5 µl	Uni-G Primer (1 µM)
	1,0 µl	Multiscribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)
10 µl		RNA-Ansatz
	5,0 µl	RNA-Lösung
	5,0 µl	RNAse freies Wasser
= 20 µl		Gesamtansatz

Die Ansätze durchliefen dann im Thermocycler die einzelnen Schritte der RT-Programms (Tabelle 25).

Tabelle 25: RT-Programm im Thermocycler

<i>Schritt</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>
1	10 Min	25°C
2	120 Min	37°C
3	5 Sec	85°C
4	4°C	∞

Die 20 µl des resultierenden cDNA-Ansatzes wurden mit 80 µl RNAse-freiem Wasser 1:5 verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Quantitative Real-Time PCR

Die Real Time quantitative PCR (RT qPCR) wurde mit Hilfe des POWER SYBER Green Kits durchgeführt. Die Detektion des PCR-Produktes beruht hierbei auf dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Der daraus resultierende DNA-Farbstoff-Komplex zeigt ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal als der Farbstoff alleine. Das

Fluoreszenzsignal wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen und steigt somit proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produktes.

Die Spezifität des SYBR Green PCR Produktes wurde am Ende jedes Laufes durch eine Schmelzkurvenanalyse kontrolliert, bei der das Amplifikat über eine kontinuierliche Temperaturerhöhung (60°C - 95°C) aufgeschmolzen, der Farbstoff freigesetzt und die Fluoreszenzabnahme registriert wurde. Da die Schmelztemperatur durch die Länge, die Sequenz und den GC-Gehalt des DNA-Doppelstranges bestimmt wird, können unspezifische PCR Produkte durch das Auftreten von mehr als einem Peak in der Schmelzkurve erkannt werden.

Pro Ansatz wurden 19 µl Mastermix in speziellen 96-well Real-time PCR Platten vorgelegt und dann jeweils 1 µl cDNA-Verdünnung zugegeben so dass sich pro qPCR-Gesamtansatz 20 µl ergaben (Tabelle 26).

Tabelle 26: Real-Time PCR Ansatz

<i>Menge (gesamt)</i>	<i>Menge</i>	<i>Bezeichnung</i>
19 µl		Mastermix
+	10 µl	POWER SYBER GreenMasterMix
	0,2 µl	Forward Primer (10 µM)
	0,2 µl	Reverse Primer (10 µM)
	8,6 µl	RNase freies Wasser
1 µl		cDNA-Verdünnung
= 20 µl		Gesamtansatz

Die 96-well Real-time PCR Platte wurde mit Folie abgeklebt und vor dem Start der qPCR (Tabelle 27) kurz bei 1000 rpm zentrifugiert.

Tabelle 27: Real Time PCR Programm

<i>Schritt</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Wiederholungen</i>
1	10 Min	95°C	Schritt 2-3 (40 Zyklen)
2	15 Sec	95°C	
3	1 Min	60°C	

Die Quantifizierung des PCR-Produktes basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Cycle Threshold (Ct-Wert). Der Cycle Threshold ist der erste PCR-Zyklus, beidem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt.

Absolute Quantifizierung der viralen RNA-Genomsegmente

Bei der absoluten Quantifizierung eines PCR-Produktes, wird jedem gemessenen Ct-Wert eine Startkopienzahl zugeordnet. Hierfür wird ein Plasmid-Standard verwendet, welcher die zu amplifizierende Sequenz in bekannter Startkopienzahl enthält. Die Ct-Werte der unterschiedlichen Standardverdünnungen werden gegen den dekadischen Logarithmus der Startkopienzahl aufgetragen und ergeben somit die für die absolute Quantifizierung des Amplifikats benötigte Standardkurve.

Als Standard wurde das pHW2000 Plasmid verwendet, welches jeweils die Sequenz des entsprechenden viralen RNA-Genomsegmentes in einfacher Ausführung enthält (Tabelle 15). Die DNA-Konzentration der Plasmid-Standards wurde am NanoDrop Spectrophotometer gemessen und die Kopienzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Teilchenzahl[Kopien}/\mu\text{l}] = 6 \times 10^{23} [\text{Kopien/mol}] \times \text{Konzentration}[\text{g}/\mu\text{l}] / \text{MW}[\text{g/mol}]$$

$$6 \times 10^{23} [\text{Kopien/mol}] = \text{Avogadro-Konstante } N_A$$

$$660 [\text{g/mol}] = \text{MW für dsDNA pro Basenpaar [bp]}$$

Die entsprechenden Plasmid-Standards wurden in einer logarithmischen Verdünnungsreihe verdünnt und bei jedem Real-Time PCR-Durchlauf mitgeführt.

2.2.5 LDH-Assay

Der LDH-Assay wird zur Messung der Zytotoxizität *in vitro* angewendet, und basiert auf der Aktivitätsmessung der Laktatdehydrogenase (LDH). Die LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches ubiquitär in Zellen exprimiert und nach Schädigung der Plasmamembran in den Überstand abgegeben wird. Im Gegensatz zu vielen anderen zytoplasmatischen Bestandteilen ist die LDH außerhalb der Zelle sehr stabil und wird nur sehr langsam abgebaut. Die LDH oxidiert Laktat zu Pyruvat. Durch den im Kit enthaltenen Katalysator Diphorase wird dabei das gelbbare Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu rot gefärbtem Formazan-Salz reduziert, welches ein breites Absorptionsspektrum bei 500 nm aufweist. Die Menge an gebildetem Formazan-Salz kann

photometrisch quantifiziert werden. Sie korreliert mit der LDH-Aktivität und dementsprechend mit der Menge an untergegangenen Zellen.

Zur Messung der Zytotoxizität in den *ex vivo* Lungengewebekulturen wurde das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche verwendet. Die humanen Lungengewebeproben wurden wie unter 3.2.1.7 beschrieben vorbereitet und in 24-Well Platten in jeweils 1,5 ml RPMI Infektions- und Kultivierungsmedium (10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) und als Kontrolle in jeweils 1,5 ml PBS (1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) eingewogen. Die Platten wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 0,5, 16, 24, 48 und 72 Stunden wurden sowohl der Überstand als auch die Gewebeprobe entnommen, wobei es sich jeweils um Triplikate handelte. Die Gewebeproben wurden kurz trocken getupft, in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei -20°C gelagert. Die Überstände wurden 10 Min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und ebenfalls bei -20 °C gelagert. Für die Homogenisierung wurden die Gewebeproben in 8facher Menge (bezogen auf das Probengewicht) Aufschlussmedium (entsprechendes Inkubationsmedium, 1% (v/v) Triton X-100) in Lysing Matrix D Röhrchen aufgenommen und im FastPrep®-24 Gewebehomogenisator 3x bei 6 m/s für 30 Sek homogenisiert. Die Überstände wurden abgenommen und 10 Min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die gesammelten Überstände wurden bis zur LDH-Aktivitätsmessung auf Eis gelagert. In einer 96-Well Maxisorp Platte wurden jeweils 50 µl Probe vorgelegt, wobei die Kulturüberstände 1:2 in dem entsprechenden Kultivierungsmedium und die Gewebelysate 1:25 in dem entsprechenden Aufschlussmedium verdünnt wurden. Als Leerwertkontrollen dienten mitgeführte entsprechende Kultivierungs- und Aufschlussmedien mitgeführt. Pro Well wurden 50 µl der nach Herstellerangaben frisch angesetzten Reaktionslösung zugegeben und die Platte für 30 Min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorbtion im ELISA Reader bei 490 nm gemessen. Die Zytotoxizität wurde wie folgt berechnet (Booth et al. 2004):

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{LDH-Aktivität (ÜS)}}{\text{LDH-Aktivität (Lysat)} + \text{LDH-Aktivität (ÜS)}} \times 100$$

3 Ergebnisse

In Zusammenarbeit mit Dr. Viola Weinheimer (RKI) und PD Dr. Thorsten Wolff (RKI) erfolgte die Etablierung eines Infektionsmodells für *ex vivo* kultiviertes Lungengewebe. Dafür wurde zunächst der strukturelle und funktionelle Erhalt des Gewebes in Kulturmedium über die Zeit analysiert (Abschnitt 3.1). Anschließend wurde die Vermehrungsfähigkeit der verschiedenen Viren in humanem Lungengewebe vergleichend untersucht (Abschnitt 3.2.1). Auf Grund der dabei für Pan/99 (H3N2) und Dk/Alb (H12N5) beobachteten großen Diskrepanz zwischen der Replikationskinetik und der Anzahl der infizierten Zellen im Gewebe wurde insbesondere die unterschiedliche Replikationsfähigkeit beider Viren im Lungengewebe näher beleuchtet (Abschnitt 3.2.2). Nach Dokumentation der Rezeptorexpression und -verteilung in den unterschiedlichen Zelltypen im Gewebe (Abschnitt 3.2.3) wurde der Zelltropismus der verschiedenen Viren verglichen (Abschnitt 3.2.4, 3.2.5). Mittels Lebendgewebemikroskopie wurde zudem der durch die Influenzavirusinfektion bedingte alveolare Zellschaden dokumentiert (Abschnitt 3.2.7).

Die Replikationsfähigkeit sowie die Antigenverteilung des MERS-CoV und des H5N1 Virus im Gewebe wurden zunächst verglichen (Abschnitt 3.3.1), woraufhin der Zelltropismus des MERS-CoV sowie die MERS-CoV-Rezeptorexpression in der humanen Lunge dokumentiert wurden (Abschnitt 3.3.2, 3.3.3). Schließlich wurde MERS-CoV-infiziertes Gewebe sowie die BAL eines MERS-CoV-infizierten Patienten mittels Immunhistochemie hinsichtlich alveolärer Schädigung untersucht (Abschnitt 3.3.4).

3.1 Etablierung eines *ex vivo* Lungengewebekulturmodells

Für die *ex vivo* Lungengewebekultur wurde ausschließlich das bei Tumorresektionen anfallende tumorfreie Randgewebe verwendet (Abbildung 9). Das Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen auf Eis zu kleinen Gewebezylindern (ca. 3 mm Höhe x 8 mm Durchmesser) ähnlicher Größe präpariert und, vor der Infektion mit den verschiedenen Viren, über Nacht in Zellkulturmedium bei 37°C inkubiert.

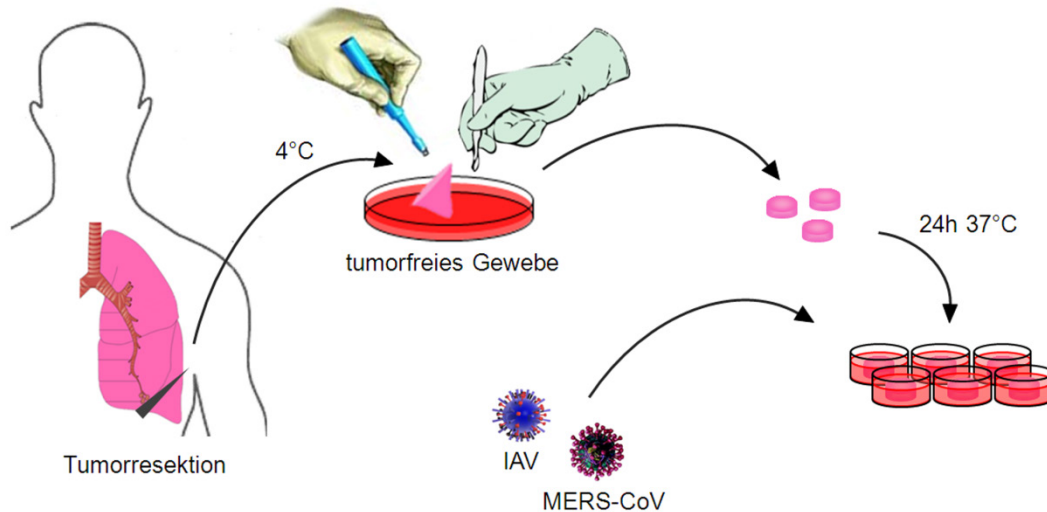


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Lungengewebepräparation für die *ex vivo* Kultivierung und Infektion.

Aus Tumorresektionen stammendes tumorfreies humanes Lungengewebe wurden bei 4°C mittels Skalpell und Biopsiestanzen kleine Gewebezylinder präpariert. Diese wurden dann über Nacht bei 37°C in Zellkulturmedium inkubiert und anschließend mit Influenzaviren oder MERS-CoV infiziert.

Die Vorinkubation im Brutschrank wurde durchgeführt damit sich das Gewebe, nach dem durch die Resektion und Präparation akut verursachten Zellstress im Gewebeverband, wieder einem möglichst physiologischen basalen Verhalten annähern kann.

3.1.1 Struktureller Gewebeerhalt und Zytotoxizität über 72 h *ex vivo* Kultivierung

Voraussetzung für infektionsbiologische Untersuchungen an *ex vivo* Gewebekulturen ist intaktes lebendes Gewebe. Um den strukturellen Gewebeerhalt und die Zytotoxizität während der Kultivierung in RPMI Medium über die Zeit zu untersuchen, wurde zum einen die Morphologie des bis zu 72 h kultivierten Gewebes mikroskopisch beurteilt und zum anderen ein LDH Assay durchgeführt. Die HE-Färbungen zeigten, dass sowohl die Integrität des alveolären Zellverbandes als auch die Kernmorphologie über 72 h Kultivierung in RPMI Medium erhalten bleiben (Abbildung 10).

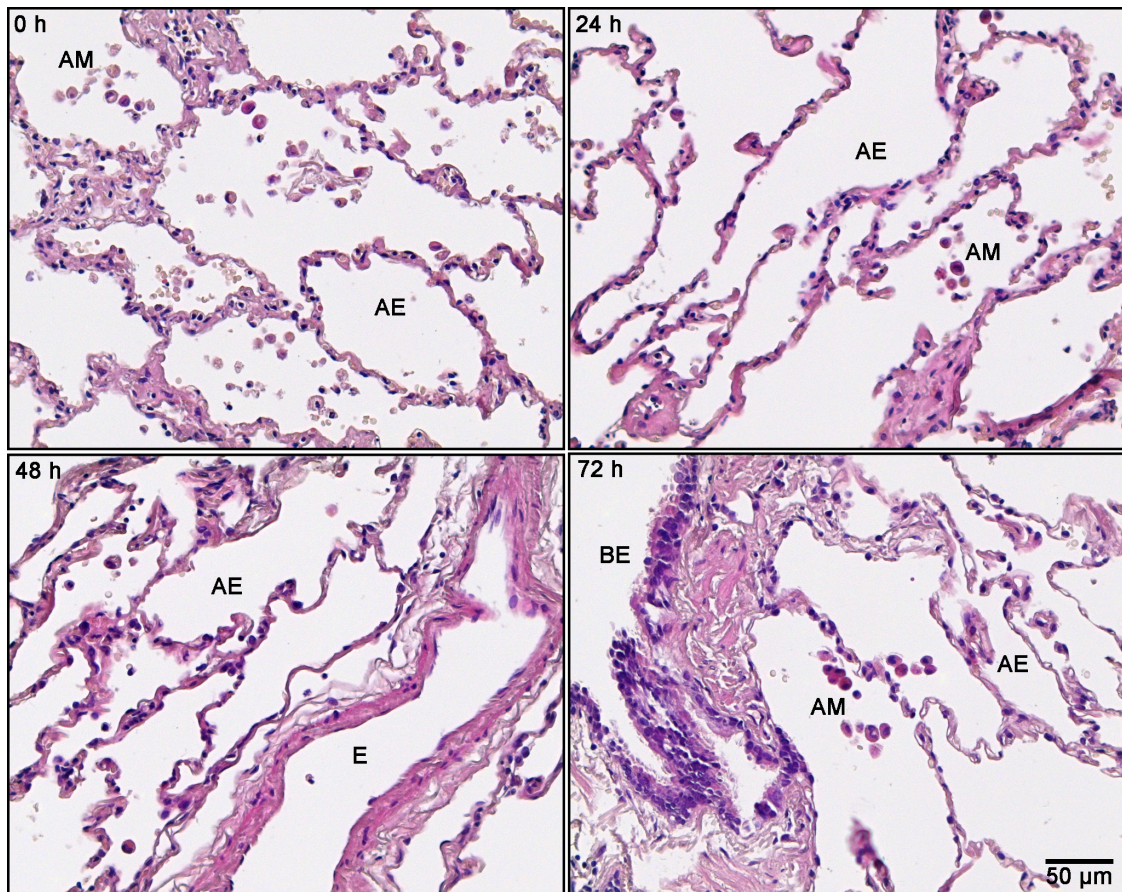


Abbildung 10: HE Übersichtsfärbungen über 72 h *ex vivo* kultivierter Lungengewebeproben.

Humane Lungengewebeproben wurden über 72 h in RPMI Medium kultiviert, zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und fixiert. Die entsprechenden Schnitte wurden HE-gefärbt. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von 3 verschiedenen Patientenproben. BE: Bronchialepithel, AE: Alveolarepithel, AM: Alveolarmakrophagen, E: Endothel.

Zur Beurteilung der Zytotoxizität in der Gewebekultur über die Zeit wurde eine LDH-Aktivitätsmessung durchgeführt. Der Anstieg der ausschließlich zytosolisch vorkommenden LDH im Überstand ist ein Marker für den Verlust der Membranintegrität der Zelle, welcher z.B. bei Nekrose der Zelle auftritt.

Humanes Lungengewebe wurde bis zu 72 h in RPMI Medium kultiviert. Die Entnahme des Überstandes und der Gewebeprobe erfolgte jeweils zu definierten Zeitpunkten (0,5, 16, 24, 48, 72 h). Die LDH-Aktivität wurde im Überstand und in dem entsprechenden Gewebelysat gemessen, woraufhin die Zytotoxizität zu den entsprechenden Zeitpunkten berechnet wurde. Kurze Zeit nach der Gewebepräparation zu Beginn der Kultivierung zwischen 0,5 und 16 h kam es zunächst zu einem Anstieg der Zytotoxizität von ca. 5 auf 15 %. Während des

wesentlich längeren Zeitraums zwischen 16 und 72 h stieg die Zytotoxizität dann noch um weitere 5 % auf insgesamt 20 % an (Abbildung 11).

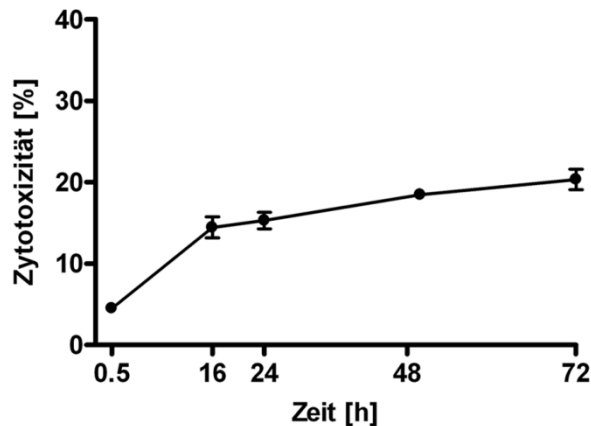


Abbildung 11: Zytotoxizität in *ex vivo* kultivierten Lungengewebeproben über 72 h.

Humane Lungengewebeproben wurden über 72 h in RPMI Medium kultiviert. Die Überstände und die Gewebeproben wurden jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Der LDH Gehalt wurde im Überstand und in dem entsprechenden Gewebelysat gemessen, wobei die Zytotoxizität wie folgt bestimmt wurde: $\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{LDH-Aktivität (ÜS)}}{\text{LDH-Aktivität (Lysat)} + \text{LDH-Aktivität (ÜS)}} \times 100$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei verschiedenen Patientenproben.

3.1.2 Apoptoserate über 72 h *ex vivo* Kultivierung

Eine indirekte Möglichkeit die Viabilität des Gewebes zu beurteilen ist die Messung der Apoptoserate.

Apoptotische Zellen im *ex vivo* kultivierten Lungengewebe wurden in dieser Arbeit mittels eines immunhistologischen Ansatzes quantifiziert. Humanes Lungengewebe wurde über 72 h in RPMI Medium kultiviert, wobei die Gewebeproben zu definierten Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 h) entnommen und fixiert wurden. Die entsprechenden Gewebeschnitte wurden gegen aktivierte Caspase 3 als Apoptosemarker gefärbt (Abbildung 12A). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Als positiv-Kontrolle wurde das Gewebe für 24 h mit Staurosporin (4 μM) stimuliert.

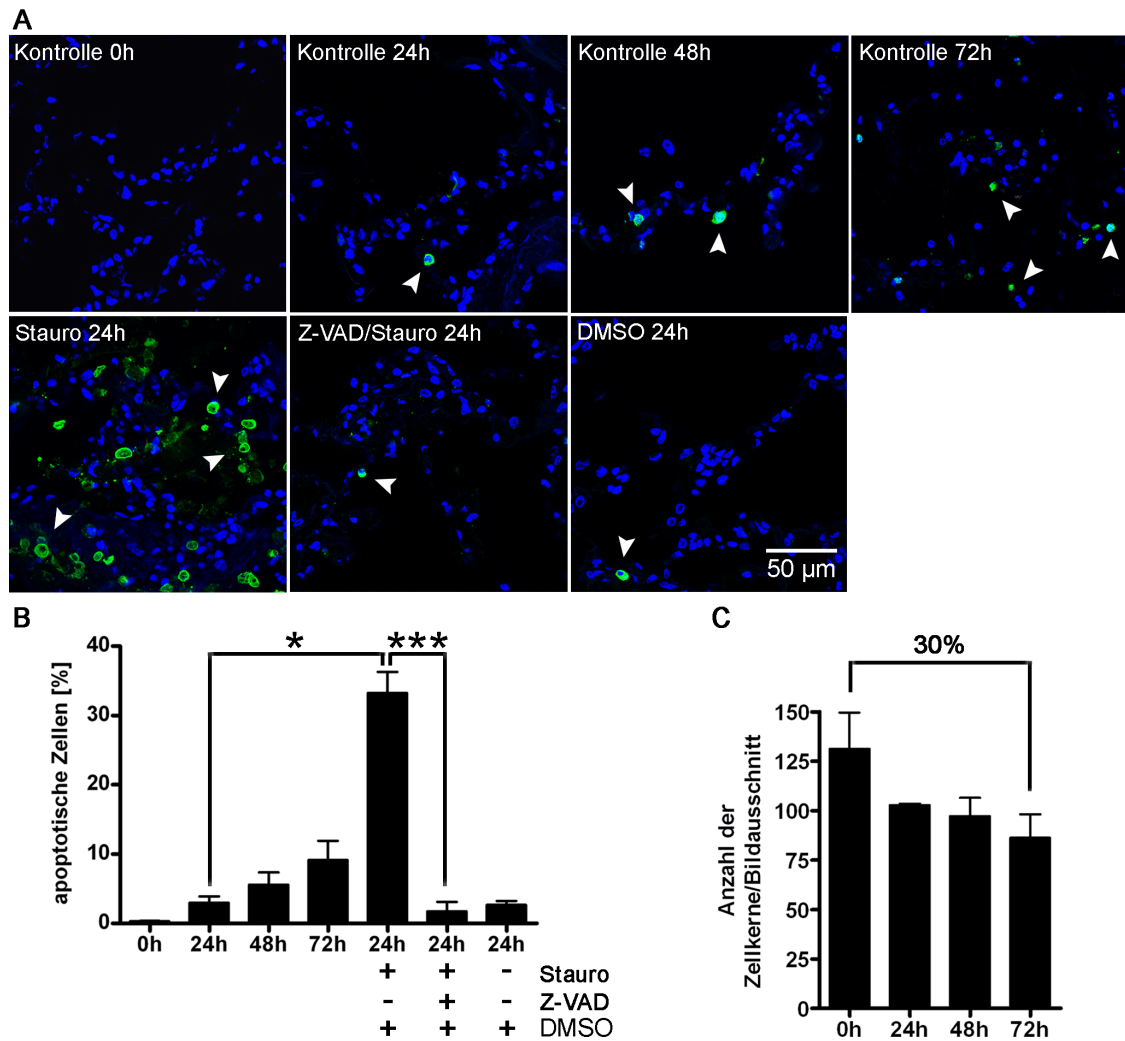


Abbildung 12: Anzahl apoptotischer Zellen in *ex vivo* kultivierten Lungengewebeproben über 72h.

(A) Gewebeschnitte der wie angegeben stimulierten Lungengewebeproben wurden zur Darstellung apoptotischer Zellen (weiße Pfeilspitze) gegen Cleaved Caspase 3 (grün) gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von 3 verschiedenen Patientenproben. (B) Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in den entsprechend stimulierten Gewebeproben berechnet sich aus der Gesamtzahl der Zellen (Zellkerne) pro Bildausschnitt und der Gesamtzahl apoptotischer Zellen pro Bildausschnitt, welche mittels digitaler Bildanalyse erfasst wurden. Die entsprechenden Zellzahlen wurden jeweils über 10 Bildausschnitte pro Gewebeschnitt gemittelt. (C) Darstellung der Gesamtzahl der Zellkerne pro Bildausschnitt über 72 h. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei verschiedenen Patientenproben.

Die Färbung gegen aktivierte Caspase 3 zeigte in den mit Staurosporin behandelten Schnitten einen deutlichen Anstieg an apoptotischen Zellen, was durch vorherige Zugabe des Pan-Caspase Inhibitors zVAD-FMK (50 µg/ml) vollständig verhindert werden konnte. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in den entsprechenden Gewebeproben berechnet sich aus der Gesamtzahl der Zellen (Zellkerne) pro Bildausschnitt und der Gesamtzahl

apoptotischer Zellen pro Bildausschnitt, welche mittels digitaler Bildanalyse erfasst wurden. Die entsprechenden Zellzahlen wurden jeweils über 10 Bildausschnitte pro Gewebeschnitt gemittelt (Abbildung 12B). Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen im kultivierten Gewebe steigt nach 24 h nur leicht auf 3 %, nach 72 h auf ca. 10 % an. Stimulation mit Staurosporin für 24 h erhöht den Anteil apoptotischer Zellen gegenüber der unbehandelten Probe von ca. 3 % auf 33 %. Während nach 72 h Kultivierung der relative Anteil apoptotischer Zellen auf ca. 10 % anstieg, sank die absolute Zahl der Zellkerne pro Bildausschnitt in dem gleichen Zeitraum um etwa 30 % ab (Abbildung 12C).

3.2 Infektionsverhalten aviärer, porciner und humanpathogener Influenza A Viren in humanem Lungengewebe

3.2.1 Replikation und immunhistologischer Nachweis von viralem Antigen

Humane Lungengewebeproben wurden mit je 4×10^5 pfu des entsprechenden Virus infiziert. In den zu festgelegten Zeiten (1, 16, 24, 48 h) entnommenen Kulturüberständen wurden mittels Plaque Assay die Anzahl infektiöser Partikel bestimmt. Die daraus resultierenden viralen Replikationskurven zeigten, dass das hoch-pathogene H5N1 Virus (Thai/04) im humanem Lungengewebe ebenso effizient repliziert wie das saisonale H3N2 Virus (Pan/99) (Abbildung 13A). Das niedrig-pathogene aviäre H12N5 Virus (Dk/Alb) sowie das porcine H1N1 Virus (Sw/Wis) replizieren dagegen kaum. Das Bay/09 Isolat der pandemischen H1N1 Influenza von 2009 replizierte mit ähnlicher Kinetik wie das saisonale H1N1 Virus (NC/99), (Abbildung 13B).

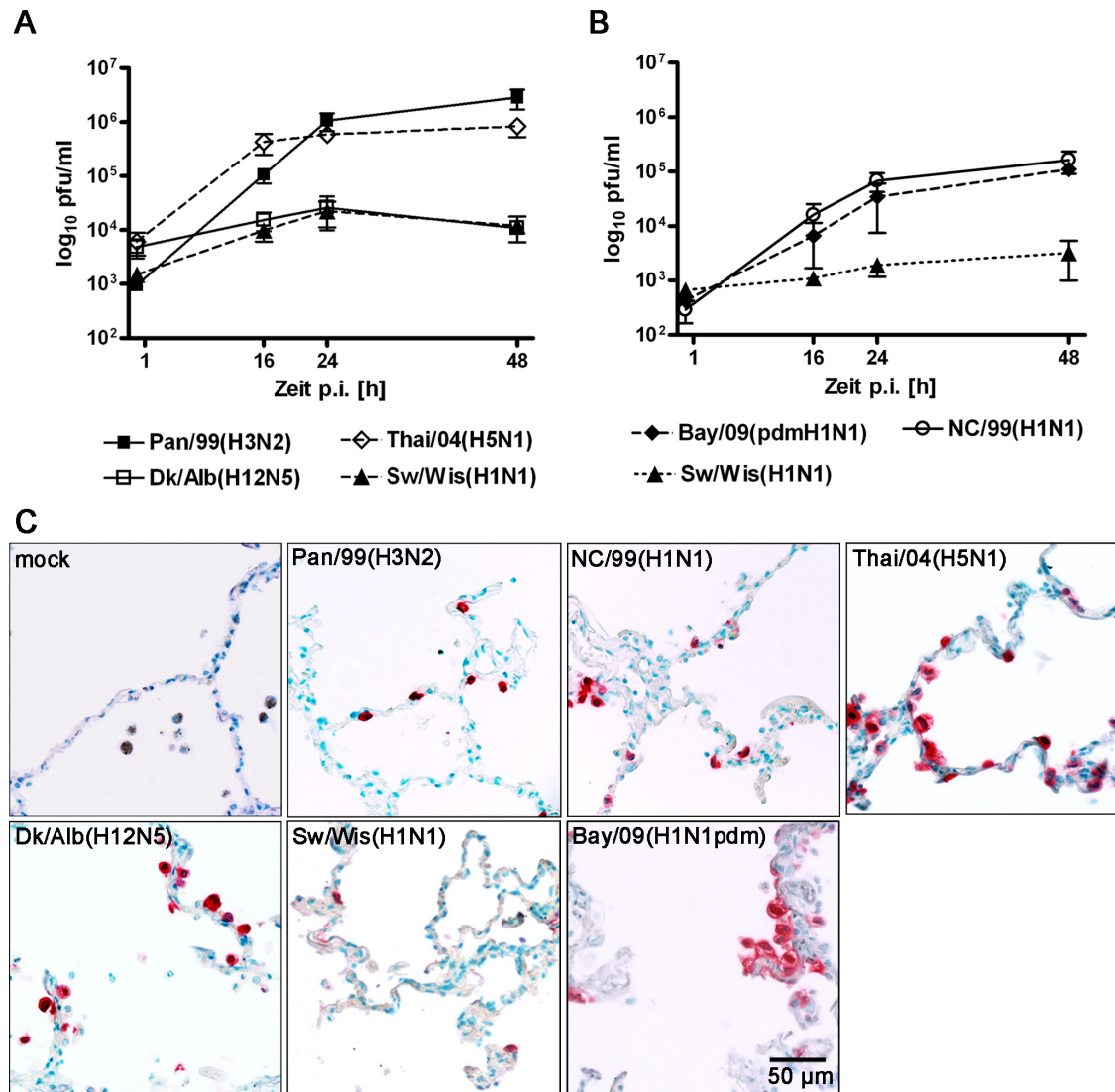


Abbildung 13: Replikation und immunhistologischer Nachweis von viralem Antigen in *ex vivo* infizierten Lungengewebe.

Lungengewebeproben wurden mit den angegebenen Viren (4×10^5 pfu) infiziert. **(A)** Die zu den angegebenen Zeitpunkten genommenen Überstände wurden mittels Plaque Assay auf die enthaltene Anzahl infektiöser Einheiten getestet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 6 (A) und 3 (B) unabhängigen Experimenten. **(B)** Die Gewebeproben wurden 24 h p.i. entnommen und fixiert. Virales Influenza A-Antigen (rot) wurde mittels Immunhistochemie im Alveolarepithel nachgewiesen. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mittels Methylgrün. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von 3 verschiedenen Patientenproben. (Bild **(A)**: Viola Weinheimer)

Immunhistologische Färbungen gegen virales Antigen sollten nun zeigen, ob das deutlich unterschiedliche Replikationsverhalten der Viren im Gewebe sich auch hier widerspiegelt. Dafür wurden die Gewebeproben zunächst nach 24 h entnommen, fixiert und für die Immunhistologie aufgearbeitet. Immunfärbungen der Gewebeschnitte gegen Influenza A Antigen (rot) zeigten, dass sowohl die saisonalen Viren Pan/99(H3N2) und NC/99(H1N1), das

hoch-pathogene Virus Thai/04(H5N1), das niedrigpathogene aviäre Virus Dk/Alb(H12N5), als auch das porcine Virus Sw/Wis(H1N1) und das pandemische Virus Bay/09(H1N1pdm) Zellen im Alveoarepithel infizieren (Abbildung 13C).

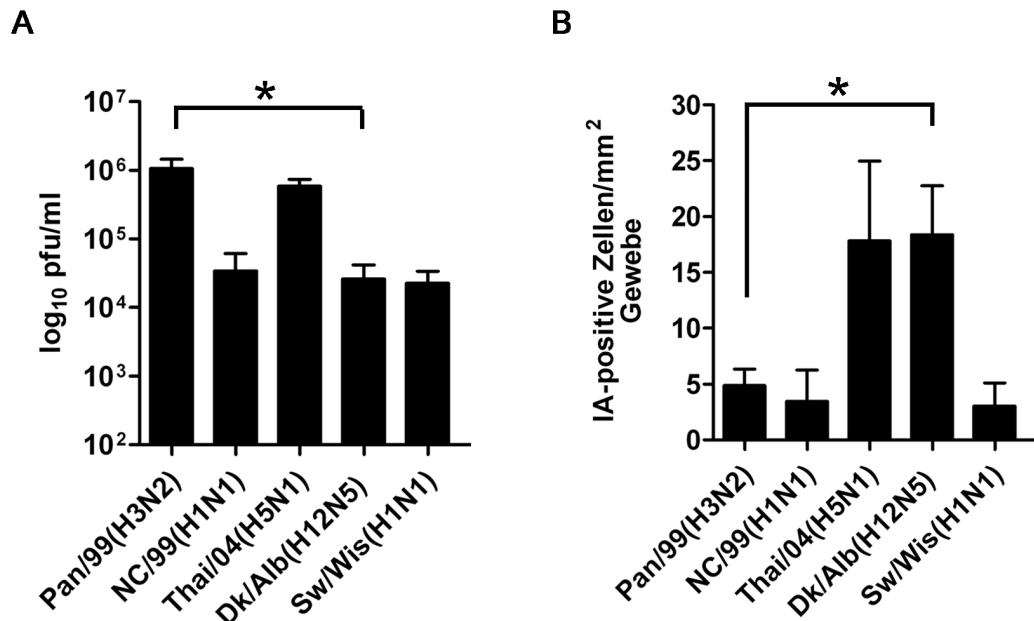


Abbildung 14: Vergleich der Zahl infektiöser Partikel im Überstand und Anzahl Influenza A Antigen-positiver Zellen im Gewebe 24 h p.i.

Lungengewebeproben wurden mit den angegebenen Viren (4×10^5 pfu) infiziert. **(A)** Die nach 24 h genommenen Überstände wurden mittels Plaque Assay auf die enthaltene Anzahl infektiöser Einheiten getestet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 6 (Pan/99(H3N2), Thai/04(H5N1), Dk/Alb(H12N5), Sw/Wis(H1N1)) oder 3 (NC/99(H1N1), H/09(H1N1pdm)) unabhängigen Experimenten. **(B)** Die Gewebeproben wurden 24 h p.i. entnommen und fixiert. Nach immunhistologischer Färbung der Gewebeschnitte gegen influenzavirales Antigen wurden positive Zellen mikroskopisch ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 (NC/99(H1N1), Thai/04(H5N1), Dk/Alb(H12N5), H/09(H1N1pdm)) oder 5 (Pan/99(H3N2), Sw/Wis(H1N1)) unabhängigen Experimenten.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Gewebeschnitte fiel auf, dass Proben, welche mit dem niedrig-pathogenen aviären Virus Dk/Alb(H12N5) infiziert wurden, deutlich mehr Influenza A-Antigen-positive Zellen aufwiesen als Proben, die mit dem saisonalen H3N2 Virus (Pan/99) infiziert waren, obwohl das saisonale Virus deutlich effizienter replizierte. Aus diesem Grund wurden alle Influenza A-Antigen-positiven Zellen pro Gewebeschnitt mikroskopisch ausgezählt. Die Zahl infizierter Zellen pro mm² Gewebe (Abbildung 14B) wurde dann mit dem 24 h Wert der Replikationskurven und damit der Anzahl infektiöser Einheiten im Kulturüberstand zu diesem Zeitpunkt verglichen (Abbildung 14A).

Es zeigte sich, dass trotz signifikant höherer Replikationseffizienz (Abbildung 14A) das saisonale Virus Pan/99(H3N2) signifikant weniger Zellen infizierte als das niedrig-pathogene aviäre Virus Dk/Alb(H12N5). Auch die Infektion mit dem hoch-pathogenen Virus Thai/04(H5N1) führte im Vergleich zu Pan/99(H3N2) zu einer signifikant höheren Anzahl an infizierten Zellen, obwohl beide Viren ähnlich effizient replizierten (Abbildung 14A). Auch das saisonale H1N1 Virus (NC/99) und das porcine H1N1 Virus (Sw/Wis) bleiben hinsichtlich der Anzahl infizierter Zellen im Gewebe deutlich hinter dem H5N1 Virus und dem niedrig-pathogenen aviären Virus Dk/Alb(H12N5) zurück.

3.2.2 Vergleich der Anzahl infektiöser und physikalischer Partikel im Überstand nach Infektion von humanem Lungengewebe und A549 Zellen mit Pan/99 (H3N2) und Dk/Alb (H12N5)

Auf Grund des Befundes, dass die Infektion mit dem niedrig-pathogenen aviären Virus Dk/Alb(H12N5) im Vergleich zum saisonalen Virus Pan/99(H3N2), bei einer deutlich schlechteren Replikationseffizienz, zu einer signifikant höheren Anzahl infizierter Zellen im Lungengewebe führte, sollte nun untersucht werden, ob die Infektion mit dem aviären Virus Dk/Alb(H12N5) im Gegensatz zum saisonalen Virus Pan/99(H3N2) eventuell einen abortiven Verlauf nimmt oder zur Freisetzung von defekten nicht-infektiösen Partikeln führt. Dafür wurden humane Lungengewebeproben mit Pan/99(H3N2) oder Dk/Alb(H12N5) mit 5×10^6 pfu ohne Zugabe von Trypsin für 24h infiziert. Anschließend wurden im Überstand die Anzahl infektiöser Partikel mittels Plaque Assay und die Anzahl der physikalischen Partikel mittels Hämagglutinationstest sowie absoluter Quantifizierung viraler Gensegmente (qPCR) bestimmt, wobei, mit der Annahme dass alle 8 Gensegmente jeweils nur einmal pro Virus enthalten sind, die Anzahl der Gensegmente die Anzahl der viralen Partikel widerspiegelt. Dabei zeigte sich, dass trotz ähnlicher Anzahl an hämagglutinierenden Partikeln im Überstand (Abbildung 15B), die Anzahl an infektiösen Partikeln nach der Infektion mit Pan/99(H3N2) 425fach höher war als mit Dk/Alb(H12N5) (Abbildung 15A). Auch die Anzahl der Kopien des M-, PB2- und des PB1-Segmentes im Überstand zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Pan/99(H3N2) und Dk/Alb(H12N5) (Abbildung 15C). Die Berechnung des Verhältnisses von infektiösen Partikeln in Form von Plaque Forming Units und physikalischen Partikeln in Form der Anzahl an hämagglutinierenden Partikel und der Kopienzahl der

Gensegmente im Gewebekulturüberstand zeigte eine deutlich größere Diskrepanz für das aviäre Virus Dk/Alb(H12N5) als für das saisonale Virus Pan/99(H3N2) (Abbildung 15D).

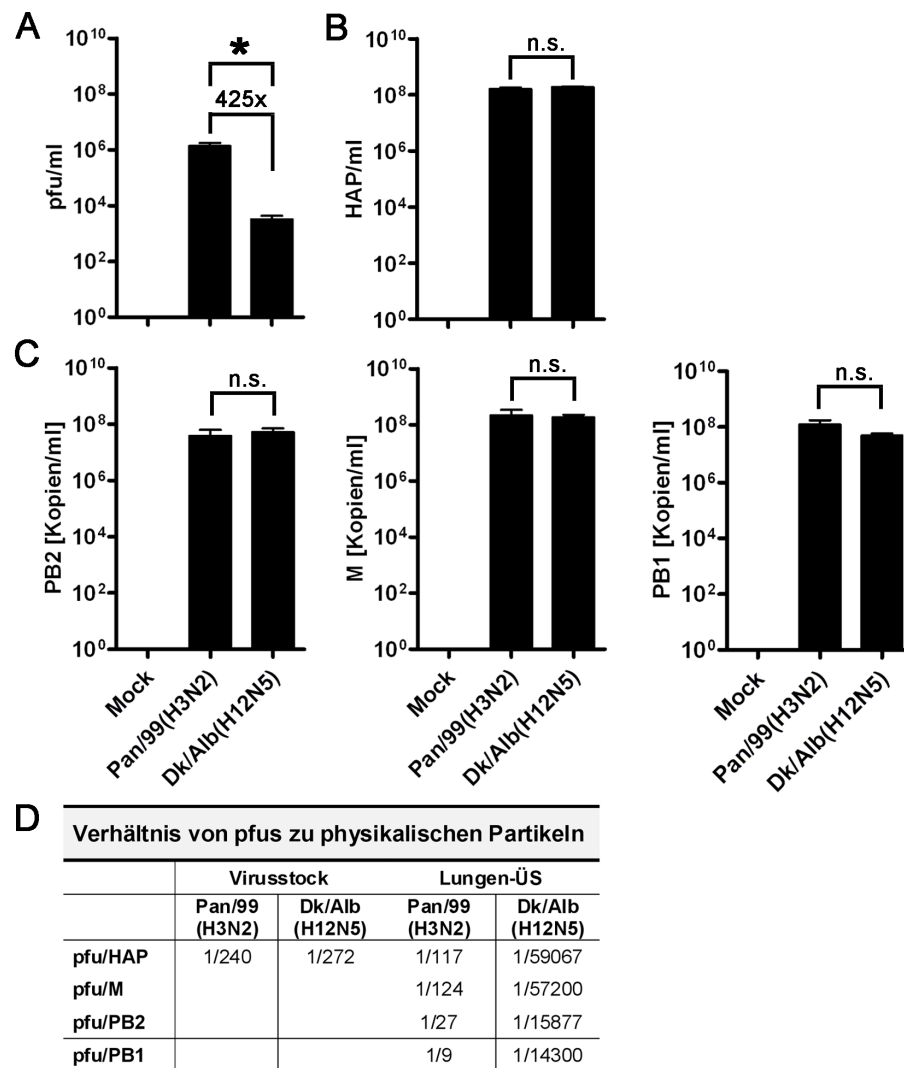


Abbildung 15: Vergleich der Anzahl von infektiösen und physikalischen Partikeln im Lungenkulturüberstand nach Infektion mit Pan/99 (H3N2) und Dk/Alb (H12N5).

Humane Lungengewebeproben wurden mit Pan/99 (H3N2) oder Dk/Alb (H12N5) mit 5×10^6 pfu ohne Zugabe von Trypsin für 24h infiziert. Anschließend wurden die Anzahl infektiöser Partikel im Überstand mittels Plaque Assay und die Anzahl der physikalischen Partikel mittels Hämagglutinationstest sowie absoluter Quantifizierung viraler Gensegmente (qPCR) bestimmt. Dargestellt sind (A) die Anzahl infektiöser und (B) hämagglutinierender Partikel sowie (C) die Anzahl der Kopien des M- und PB2- und PB1-Segmentes im Überstand. (D) Tabellarische Übersicht des Verhältnisses von Plaque Forming Units zu hämagglutinierenden Partikeln und Anzahl der angegebenen Gensegmente. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

Während in der Nachkommengeneration für Dk/Alb(H12N5) nur eine pfu-Einheit pro 59067 HAPs berechnet wurde, ergab sich für Pan/99(H3N2) mit einer pfu-Einheit pro 117 HAPs eine deutlich geringere Diskrepanz. Das Verhältnis von pfus zu HAPs im Virusstock war mit 1 zu

240 bis 1 zu 272 für beide Viren ähnlich. Während sich das Verhältnis für Dk/Alb(H12N5) deutlich in Richtung HAPs verschob, verblieb es bei Pan/99(H3N2) ähnlich zum Virusstock (Abbildung 15D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Infektion von primärem humanem Lungengewebe mit dem aviären Virus Dk/Alb(H12N5) oder dem saisonalen Virus Pan/99(H3N2) zu einer ähnlichen Zahl an physikalischen Partikeln führt, wobei der Anteil an infektiösen Partikeln bei dem aviären Virus signifikant geringer ist als bei dem saisonalen Virus, was die geringere Replikationseffizienz des aviären Virus, trotz der hohen Anzahl an infizierten Zellen im Gewebe, erklärt.

Dieser Befund sollte nun auf A549-Zellen, als Modellsystem für humane alveoläre Epithelzellen, verifiziert werden. Dafür wurden A549-Zellen mit Pan/99(H3N2) oder Dk/Alb(H12N5) (MOI 10) für 24h infiziert. Damit die Zellen nur einen Infektionszyklus durchlaufen, wurde kein Trypsin zugesetzt. Anschließend wurden im Überstand die Zahl pfus (Abbildung 16A), der HAPs (Abbildung 16B) und der viralen Gensegmente M, PB2 und PB1 wie oben beschrieben bestimmt (Abbildung 16C). Auch hier war die Anzahl pfus im Überstand nach Infektion mit dem saisonalen Virus Pan/99(H3N2) um ein vielfaches höher als mit dem aviären Virus Dk/Alb(H12N5), während die Anzahl der HAPs keinen signifikanten Unterschied zeigte. Auch die Anzahl der Kopien des M- und des PB2-Segmentes im Überstand und im Zelllysate war ohne signifikanten Unterschied (Abbildung 16D). Bei dem aviären Virus wurde auch hier eine große Diskrepanz zwischen der Anzahl an pfus und HAPs im Überstand festgestellt, welche mit einem pfu/HAP-Verhältnis von 1/8766 jedoch um eine Log-Stufe geringer war als im Überstand der Gewebekultur. Die gleiche Diskrepanz wurde ebenfalls in dem Verhältnis von pfus zu der Anzahl der Kopien des M-, PB1- und des PB2-Segmentes mit 1/5930, 1/1180 und 1/394 deutlich. Bis auf das PB2-Segment befinden sich die absoluten Zahlen der viralen Gensegmente im Überstand in der gleichen Log-Stufe wie die Anzahl der HAPs, was darauf schließen lässt, dass pro Viruspartikel jeweils eine Kopie der viralen Gensegmente verpackt wurden. Das pfu/HAP-Verhältnis für das saisonale Virus verblieb mit 1/152 auf einem ähnlichen Niveau zum Virusstock und zum Gewebekulturüberstand (Abbildung 16E). Auch die Verhältnisse von pfus zu der Anzahl der Kopien des M- und PB1-Segmentes mit 1/90 und 1/45 und entsprachen eher dem Verhältnis im Virusstock, wobei das pfu/PB2-Verhältnis mit 1/3 leicht abwich.

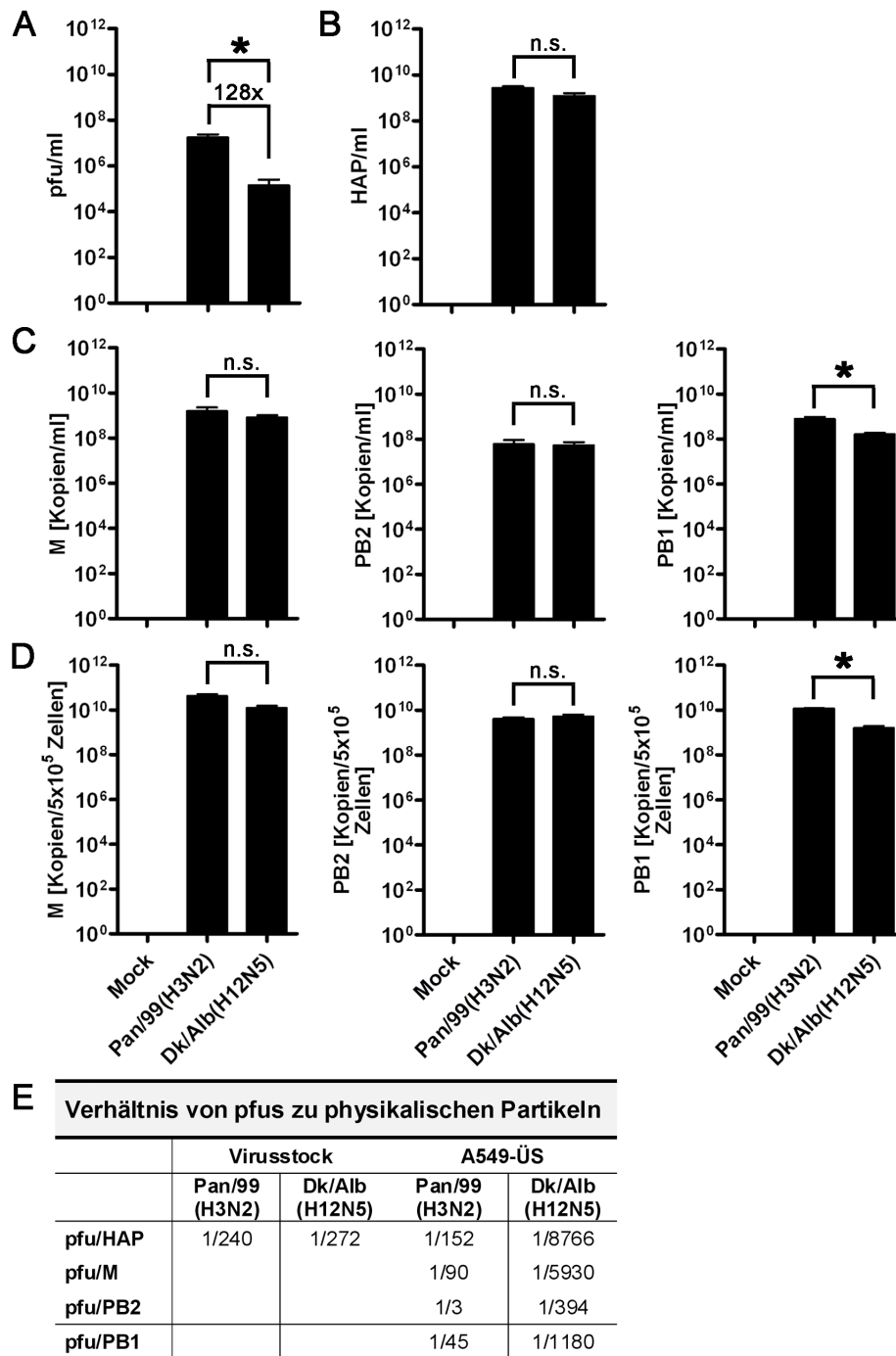


Abbildung 16: Vergleich der Anzahl von infektiösen und physikalischen Partikeln im Zellkulturüberstand nach Infektion von A549-Zellen mit Pan/99 (H3N2) und Dk/Alb (H12N5).

A549-Zellen wurden mit Pan/99 (H3N2) oder Dk/Alb (H12N5) (MOI 10) ohne Zugabe von Trypsin für 24h infiziert. Anschließend wurden die Anzahl infektiöser Partikel im Überstand mittels Plaque Assay und die Anzahl der physikalischen Partikel mittels Hämagglutinationstest sowie absoluter Quantifizierung viraler Gensegmente (qPCR) bestimmt. Dargestellt sind **(A)** die Anzahl infektiöser und **(B)** hämagglutinierender Partikel sowie **(C)** die Anzahl der Kopien des M- und des PB2- und PB1-Segmentes im Überstand. **(D)** Anzahl der Kopien des M- und des PB2- und PB1-Segmentes im Zelllysate. **(E)** Tabellarische Übersicht des Verhältnisses von pfu zu hämagglutinierenden Partikeln und Anzahl der angegebenen Gensegmente. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.2.3 Rezeptorbesatz

Man geht davon aus, dass die Wirtsspezifität der Influenza Viren vor allem mit der Rezeptorpräferenz des Virus verknüpft ist, wobei humanpathogene Viren vorrangig Sialinsäurekonjugate mit $\alpha 2,6$ -glykosidische Bindung (SA $\alpha 2,6$ Gal) und aviäre Viren Sialinsäurekonjugate mit $\alpha 2,3$ -glykosidische Bindung (SA $\alpha 2,3$ Gal) als Rezeptor nutzen. Um die Expression und Verteilung des aviären (SA $\alpha 2,3$ Gal) und humanen (SA $\alpha 2,6$ Gal) Rezeptors in diesem Modell zu untersuchen, wurden ebenfalls Lektinfärbungen an Gewebeschnitten nicht infizierter Lungenproben durchgeführt, wobei zur Detektion von α -2,6- und α -2,3-gebundenen Sialinsäuren jeweils das *Sambucus Nigra* Lektin (SNA) bzw. das *Maackia Amurensis* Lektin (MAA) Verwendung fand. Die Färbungen zeigten, dass sowohl der aviäre (SA $\alpha 2,3$ Gal) als auch der humane (SA $\alpha 2,6$ Gal) Rezeptor im Bronchial- als auch im Alveolarepithel sowie auf Alveolarmakrophagen exprimiert werden (Abbildung 17).

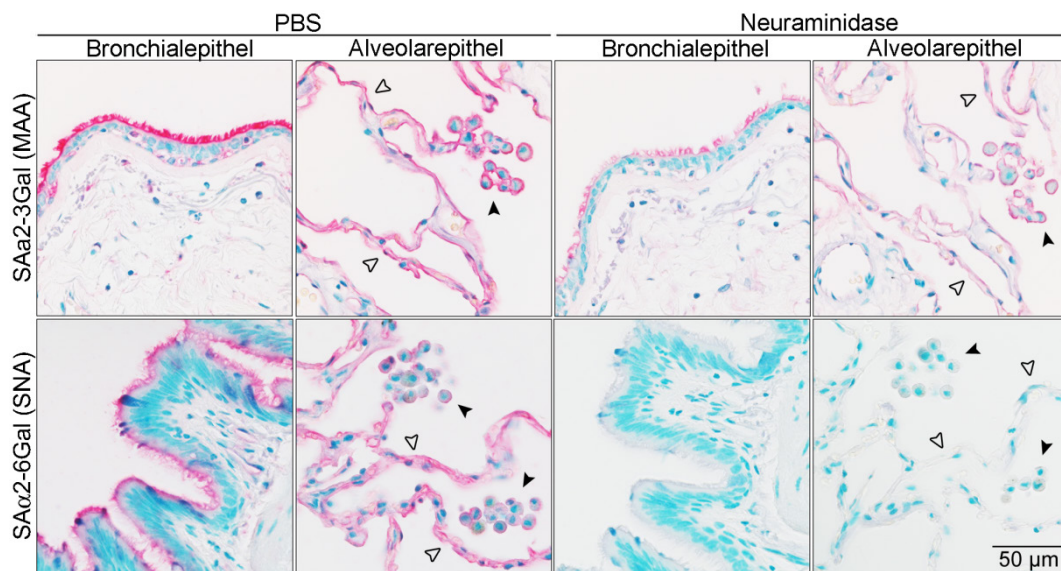


Abbildung 17: Nachweis des humanen (SA $\alpha 2,6$ Gal) und aviären (SA $\alpha 2,3$ Gal) Influenzavirusrezeptors in humanem Lungengewebe.

Gewebeschnitte nicht infizierter Proben wurden mit *Sambucus Nigra* Agglutinin (SNA) oder *Maackia Amurensis* Agglutinin (MAA) inkubiert um SA $\alpha 2,6$ Gal (rot) oder SA $\alpha 2,3$ Gal (rot) anzufärben. Alveolarepithel (offene Pfeilspitze), Alveolarmakrophagen (schwarze Pfeilspitze).

Die Gewebeschnitte wurden vorher über Nacht bei 37°C mit PBS oder Neuraminidase inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

Um die Spezifität der Färbung nachzuweisen, wurden die Gewebeschnitte zuvor 24 h bei 37°C mit Neuraminidase oder als negativ-Kontrolle mit PBS inkubiert, was zu einem vollständigen Ausbleiben der Färbung mit dem *Sambucus Nigra* Lektin (SNA) und zu einer deutlichen

Reduzierung der Färbung mit dem *Maackia Amurensis* Lektin (MAA) führte. Die lediglich reduzierte MAA-Färbung ist darauf zurück zu führen, dass das verwendete *Maackia Amurensis* Lektin (MAA) von EY Laboratories ein Gemisch der Isoformen MAA I und II ist, wobei MAA I auch eine Bindungsaffinität zu nicht-Sialinsäurekonjugaten vor allem mit Sulfatresten besitzt, welche nach der Neuraminidasebehandlung verbleiben und somit angefärbt werden (Nicholls et al. 2007).

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Rezeptorexpression innerhalb des Alveolarepithels zelltypspezifisch ist. Daher wurden im Folgenden Doppelfärbungen gegen pro-Surfactant Protein-C (proSP-C) als Typ II Zellmarker bzw. gegen Caveolin 1 als Typ I Zellmarker in Kombination mit den Rezeptorspezifischen Lektinen MAA bzw. SNA durchgeführt. Die Färbungen ergaben, dass der aviäre (SA α 2,3Gal) und humane (SA α 2,6Gal) Rezeptor sowohl auf Typ I als auch auf Typ II Zellen exprimiert werden (Abbildung 18). Beide Rezeptoren sind also im gesamten unteren Respirationstrakt exprimiert.

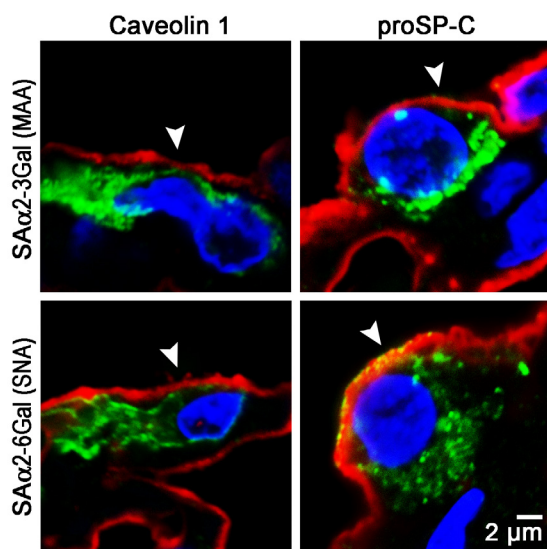


Abbildung 18: Immunhistologischer Nachweis des humanen (Saa2-6Gal) und des aviären (Saa2-3Gal) Influenzavirusrezeptors auf Typ I und Typ II Zellen.

Nicht infizierte Gewebeschnitte wurden mit *Sambucus Nigra* Agglutinin (SNA) oder *Maackia Amurensis* Agglutinin (MAA) inkubiert um Saa2-6Gal oder Saa2-3Gal (rot) anzufärben. Zusätzlich wurden die Gewebeschnitte gegen den Typ II Zellmarker proSP-C (grün) oder den Typ I Zellmarker Caveolin 1 (grün) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

3.2.4 Zelltropismus

Auf Grund der von van Riel et al. beobachteten viralen Bindungsmuster, welche zeigten, dass sowohl hoch- als auch niedrigpathogene aviäre Viren an Typ II Zellen binden während humanpathogene Viren eher an Typ I Zellen binden (van Riel et al. 2007), sollte untersucht werden, ob das unterschiedliche Replikationsverhalten der Viren auf einen unterschiedlichen Zelltropismus zurück zu führen ist.

Humane Lungengewebeproben wurden mit den saisonalen Viren Pan/99(H3N2) und NC/99(H1N1), dem hochpathogenen aviären Virus Thai/04(H5N1), dem niedrigpathogenen aviären Virus Dk/Alb(H12N5), dem porcinen Virus Sw/Wis(H1N1) und dem pandemischen Virus Bay/09(H1N1pdm) für 24 h infiziert. Paraffinschnitte der entsprechenden Proben wurden dann gegen Influenza A virales Antigen gefärbt.

Es zeigte sich zunächst, dass alle Viren Zellen das Bronchialepithel infizierten (Abbildung 19).

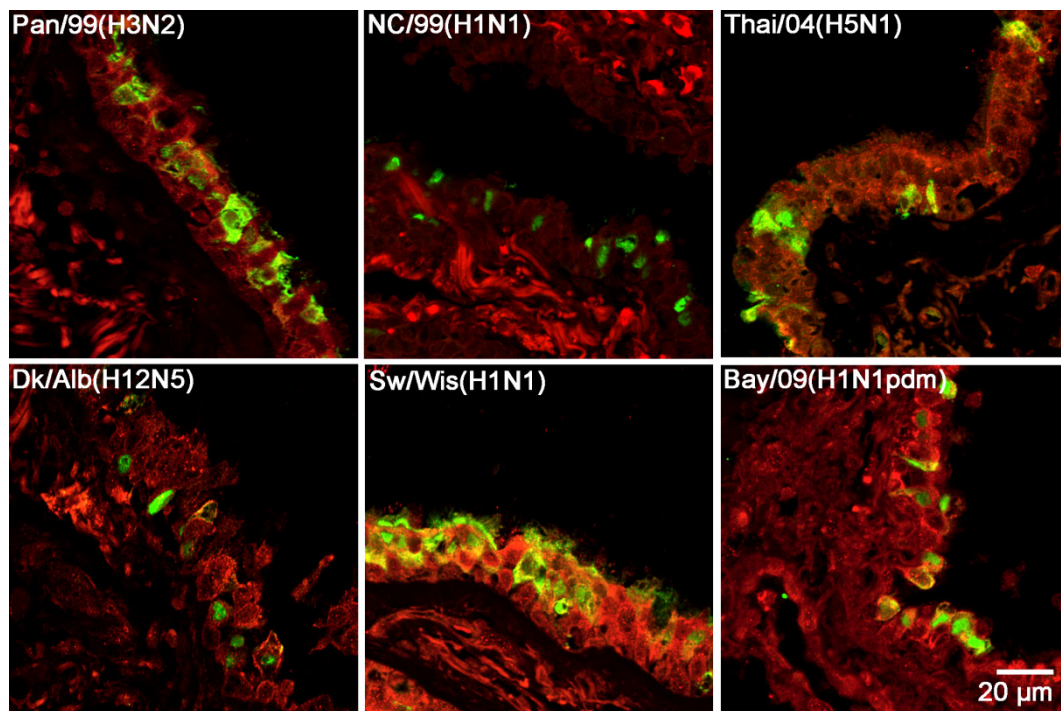


Abbildung 19: Immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen im Bronchialepithel 24h nach Infektion der Lungengewebeproben mit dem entsprechenden Virus.

Humane Lungengewebeproben wurden mit den angegebenen Viren (4×10^5 pfu) für 24 h infiziert. Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben für die Immunhistologische Analyse aufbereitet. Die Gewebeschnitte wurden gegen Influenza A-Antigen gefärbt (grün). Die Autofluoreszenz ist in Rot dargestellt. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von einer bis 3 verschiedenen Patientenproben.

Um im Alveolarepithel zwischen der Infektion von Typ I und Typ II Zellen zu unterscheiden, sollten Doppelfärbungen gegen Influenza A virales Antigen und proSP-C (pro-Surfactant Protein-C) als Typ II Zellmarker oder gegen Caveolin 1 oder EMP2 (Epithelial Membrane Protein 2) als Typ I Zellmarker durchgeführt werden. Daher wurde zunächst eine Doppelfärbung gegen den Typ II Zellmarker proSP-C und gegen den Typ I Zellmarker Caveolin 1 etabliert (Abbildung 20). Da keine Kolo-kalisation beider Farbstoffe auftrat, konnten Typ I (weiße Pfeilspitze) und Typ II Zellen (offene Pfeilspitze) mit Hilfe dieser Zellmarker somit eindeutig voneinander unterschieden werden.

Zudem ließen sich Typ II Zellen anhand der typisch kuboidalen Morphologie der Signal-positiven Zellen erkennen, welche in das alveoläre Lumen hineinragen.

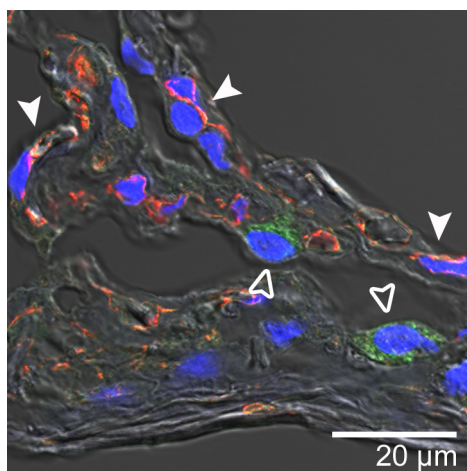


Abbildung 20: Keine Kolo-kalisation des Typ II Zellmarkers proSP-C und des Typ I Zellmarkers Caveolin 1 im Alveolarepithel.

Uninfizierte Gewebeschnitte wurden nach der Fixierung für die Immunhistologische Analyse aufbereitet. Es wurde gegen den Typ II Zellmarker proSP-C (grün) und den Typ I Zellmarker Caveolin 1 (rot) gefärbt. Typ I Zellen (weiße Pfeilspitze); Typ II Zellen (offene Pfeilspitze). Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 2 verschiedenen Patientenproben.

Humane Lungengewebeproben wurden für 24 h mit Pan/99(H3N2), NC/99(H1N1), Thai/04(H5N1), Dk/Alb(H12N5), Sw/Wis(H1N1) oder Bay/09(H1N1) (4×10^5 pfu) infiziert oder mock-infiziert. Die für die immunhistologische Analyse aufgearbeiteten Gewebeschnitte wurden gegen virales Antigen und proSP-C als Typ II Zellmarker gefärbt. Alle Viren weisen den gleichen Zelltropismus auf. Sie infizieren Typ II Zellen (Abbildung 21).

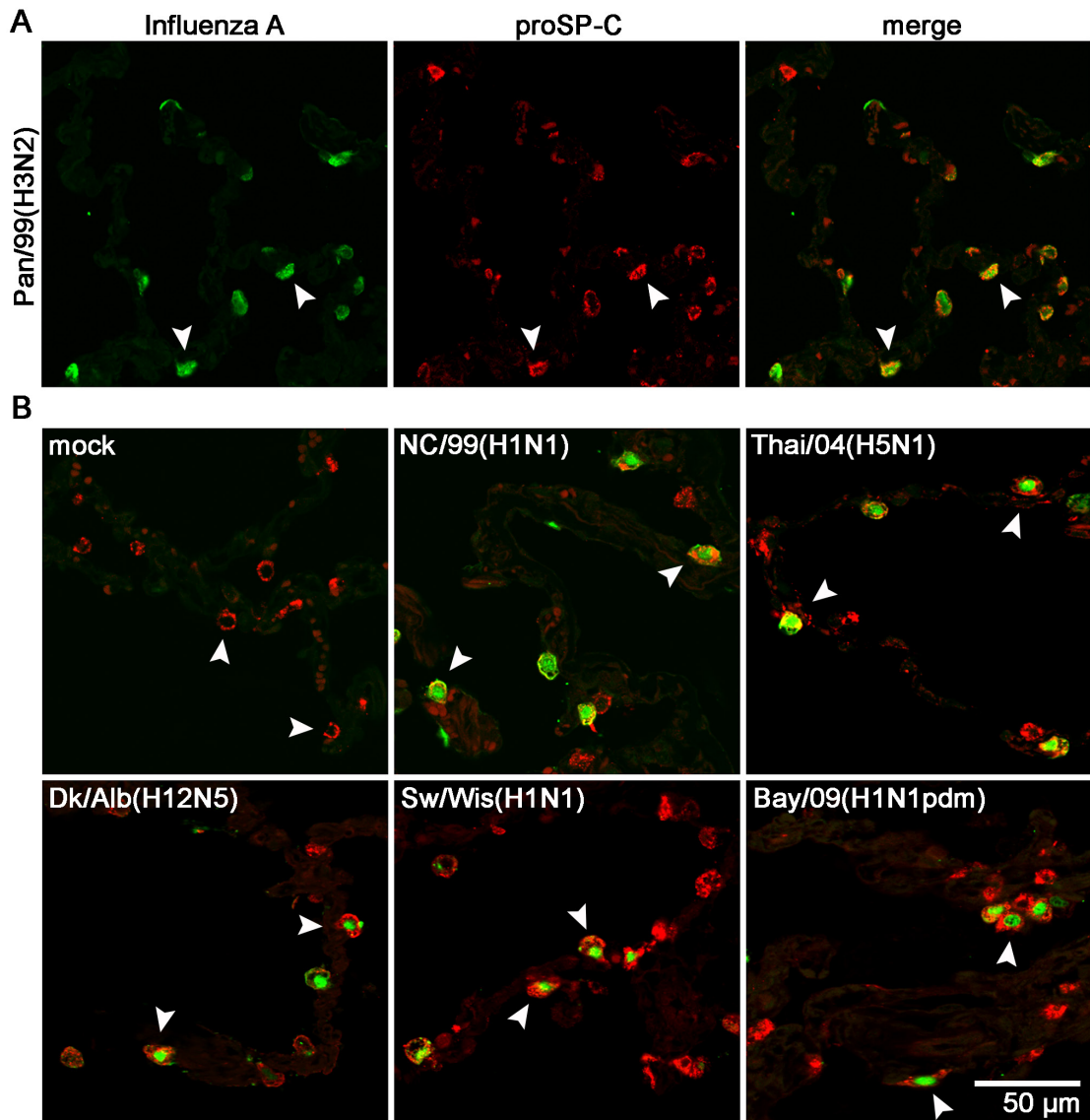


Abbildung 21: Immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen in Typ II Zellen 24 h nach Infektion der Lungengewebeproben mit dem entsprechenden Virus.

Humane Lungengewebeproben wurden mit den angegebenen Viren (4×10^5 pfu) für 24 h infiziert. Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben für die immunhistologische Analyse aufbereitet. Die Gewebeschnitte wurden gegen Influenza A-Antigen (grün) und gegen proSP-C (rot) als Typ II Zellmarker gefärbt. Influenza A-Antigen-positive Typ II Zellen (weiße Pfeilspitze). **(A)** Für Pan/99(H3N2) wurden der rote und der grüne Kanal einzeln sowie übereinander gelegt (merge) dargestellt. **(B)** Für alle anderen Virusstämme sind die Bilder der übereinander gelegten Kanäle abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

Um zu klären, ob ebenfalls Typ I Zellen infiziert werden, wurden Doppelfärbungen der infizierten Gewebeschnitte gegen virales Antigen und Epithelial Membrane Protein 2 (EMP2) als Typ I Zellmarker durchgeführt. Die EMP2-Färbung zeigte eine bandartige

Oberflächenfärbung des Alveolarepithels, welche teilweise unterbrochen war. An diesen Stellen waren Influenza A-positive Zellen zu finden. Für keines der getesteten Viren konnte eine Kolokalisation des Typ I Zellmarkers mit viralem Antigen gezeigt werden (Abbildung 22). Keines der Virusisolate infizierte demnach Typ I Zellen.

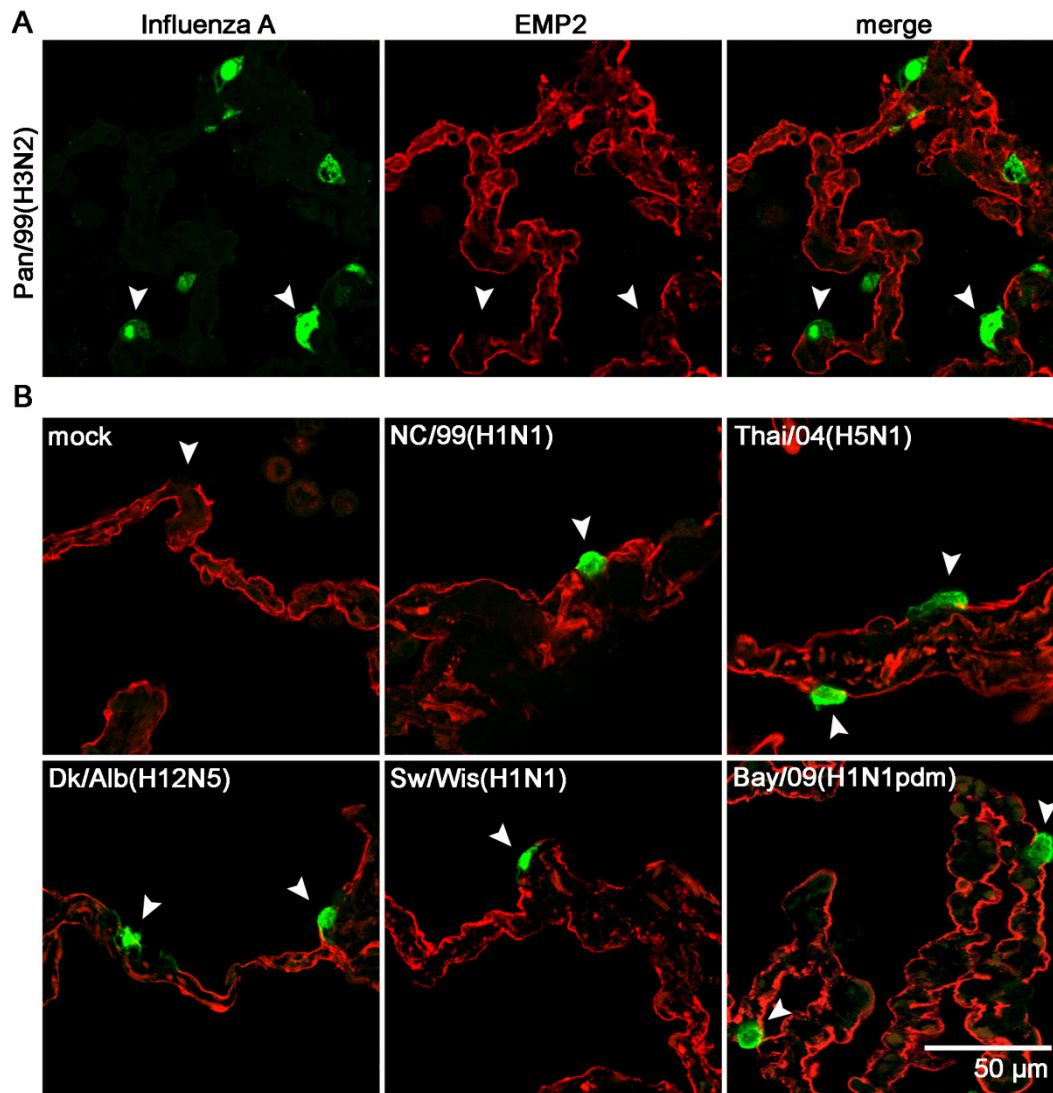


Abbildung 22: Kein immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen in Typ I Zellen 24 h nach Infektion der Lungengewebeproben.

Humane Lungengewebeproben wurden mit den angegebenen Viren (4×10^5 pfu) für 24 h infiziert. Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben für die immunhistologische Analyse aufbereitet. Die Gewebeschnitte wurden gegen Influenza A-Antigen (grün) und gegen den Typ I Zellmarker EMP2 (rot) gefärbt. Influenza A-Antigen-positive und EMP2-negative Zellen (weiße Pfeilspitze). **(A)** Für Pan/99(H3N2) wurden der rote und der grüne Kanal einzeln sowie übereinander gelegt (merge) dargestellt. **(B)** Für alle anderen Virusstämme sind die Bilder der übereinander gelegten Kanäle abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

Der Befund, dass keine Typ I Zellen infiziert wurden, konnte durch die Doppelfärbung gegen virales Antigen und Caveolin 1, einem zweiten Typ I Zellmarker, bestätigt werden (Abbildung 23). Auch hier ist keine Kolokalisation von viralem Antigen und Typ I Zellmarker zu erkennen. Dies zeigte, dass alle Viren den gleichen Zelltropismus im Alveolarepithel aufweisen und ihre unterschiedliche Replikationsfähigkeit nicht mit einem unterschiedlichen Zelltropismus erklärt werden kann.

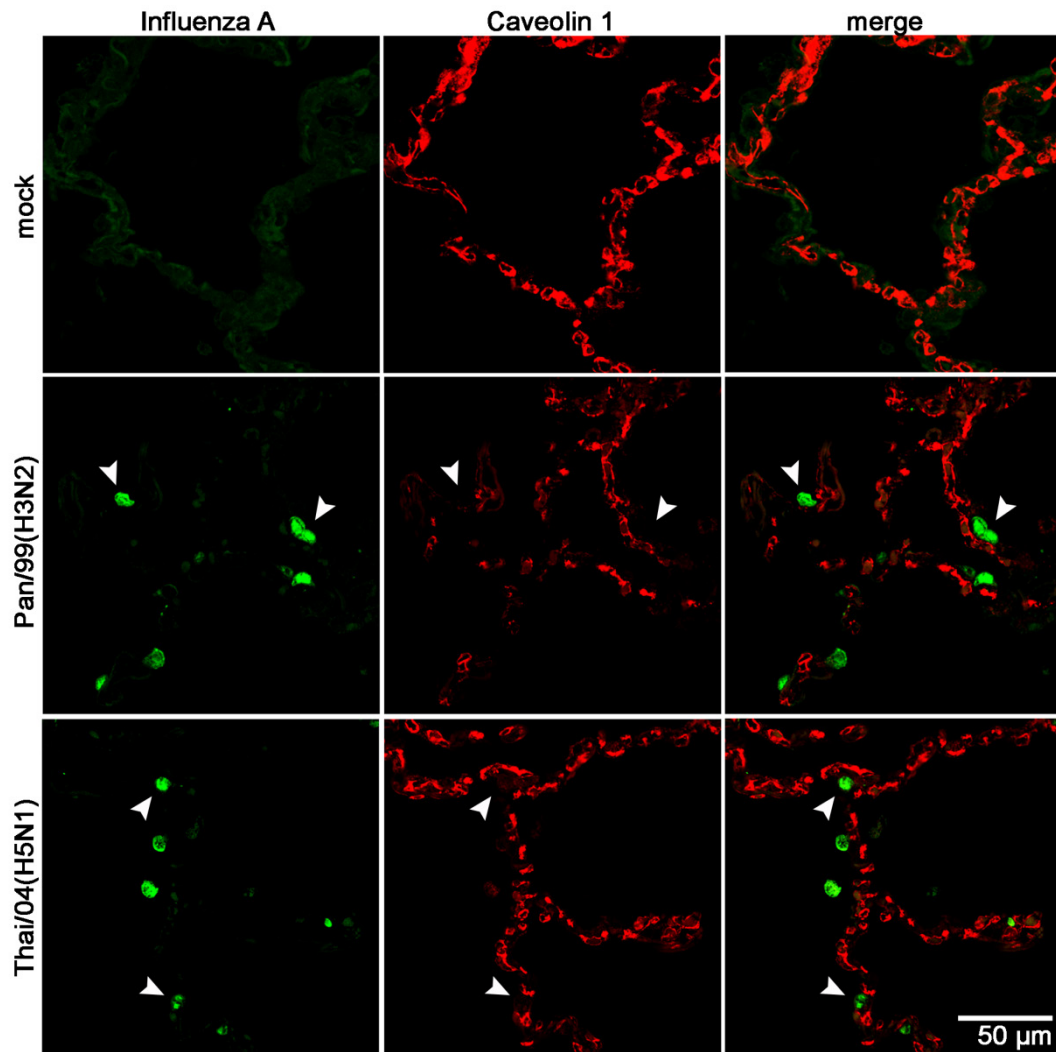


Abbildung 23: Kein immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen in Typ I Zellen 24 h nach Infektion der Lungengewebeproben.

Humane Lungengewebeproben wurden mit den angegebenen Viren (4×10^5 pfu) für 24 h infiziert. Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben für die immunhistologische Analyse aufbereitet. Die Gewebeschnitte von Pan/99(H3N2)- und Thai/04(H5N1)-infizierten Proben wurden gegen Influenza A-Antigen (grün) und gegen den Typ I Zellmarker Caveolin 1 (rot) gefärbt. Influenza A-Antigen-positive und Caveolin 1-negative Zellen (weiße Pfeilspitze). Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

Ein weiterer in der Alveole vorkommender Zelltyp sind Alveolarmakrophagen. Die Doppelfärbung von Gewebeschnitten infizierter Proben gegen CD68 als Alveolarmakrophagenmarker und gegen Influenza A virales Antigen sollte zeigen, ob auch dieser Zelltyp virales Antigen enthält. Die Färbung ließ erkennen, dass auch einige Alveolarmakrophagen virales Antigen enthielten (Abbildung 24).

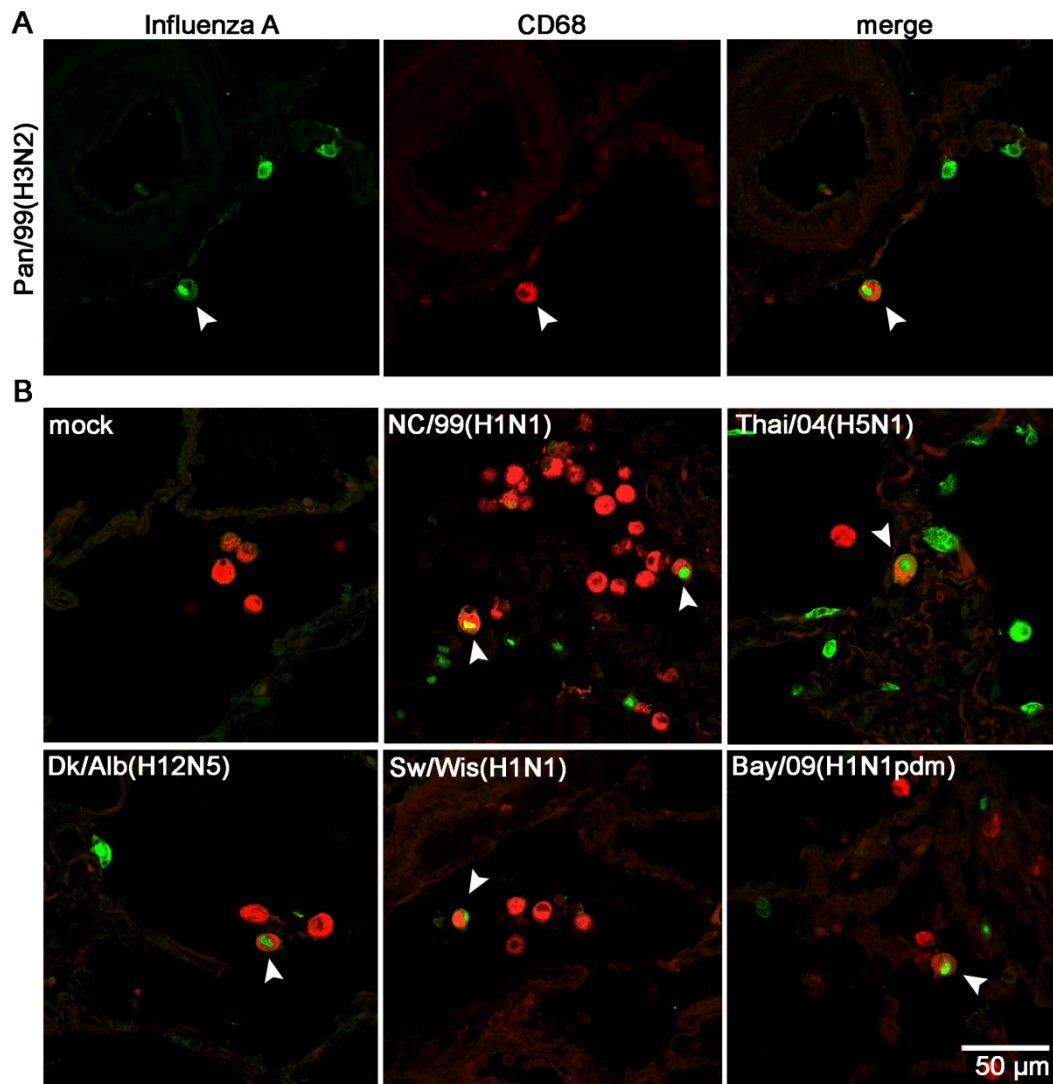


Abbildung 24: Immunhistologischer Nachweis von Influenza A-Antigen in Alveolarmakrophagen 24 h nach Infektion der Lungengewebebeben.

Humane Lungengewebebeben wurden mit den angegebenen Viren (4×10^5 pfu) für 24 h infiziert. Nach der Fixierung wurden die Gewebebeben für die immunhistologische Analyse aufbereitet. Die Gewebeschnitte wurden gegen Influenza A-Antigen (grün) und gegen den Alveolarzellmarker CD68 (rot) gefärbt. Influenza A-Antigen- und CD68-positive Zellen (weiße Pfeilspitze). **(A)** Für Pan/99(H3N2) wurden der rote und der grüne Kanal einzeln sowie übereinander gelegt (merge) dargestellt. **(B)** Für alle anderen Virusstämme wurden die Bilder der übereinander gelegten Kanäle abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 2 verschiedenen Patientenproben.

Ob es sich bei dem intrazellulär vorhandenen viralen Antigen um eine tatsächliche Infektion oder um phagozytierte Epithelzellen handelt, lässt sich durch die hier durchgeführte immunhistologische Untersuchung nicht klären.

Um den Anteil Influenza A Antigen-positiver Typ II Zellen und Alveolarmakrophagen zu bestimmen, wurden Gewebeschnitte infizierter Proben, gegen Influenza A virales Antigen, proSP-C und CD68 gefärbt (Abbildung 25A). Die Auszählung von jeweils 50 infizierten Zellen ergab, dass Alveolarmakrophagen nur 4–11% der Antigen-positiven Zellen ausmachen, während die Typ II Zelle mit einem Anteil an 89–96% infizierter Zellen die hauptsächliche Zielzelle der Influenzaviren im alveolären Kompartiment darstellt (Abbildung 25B).

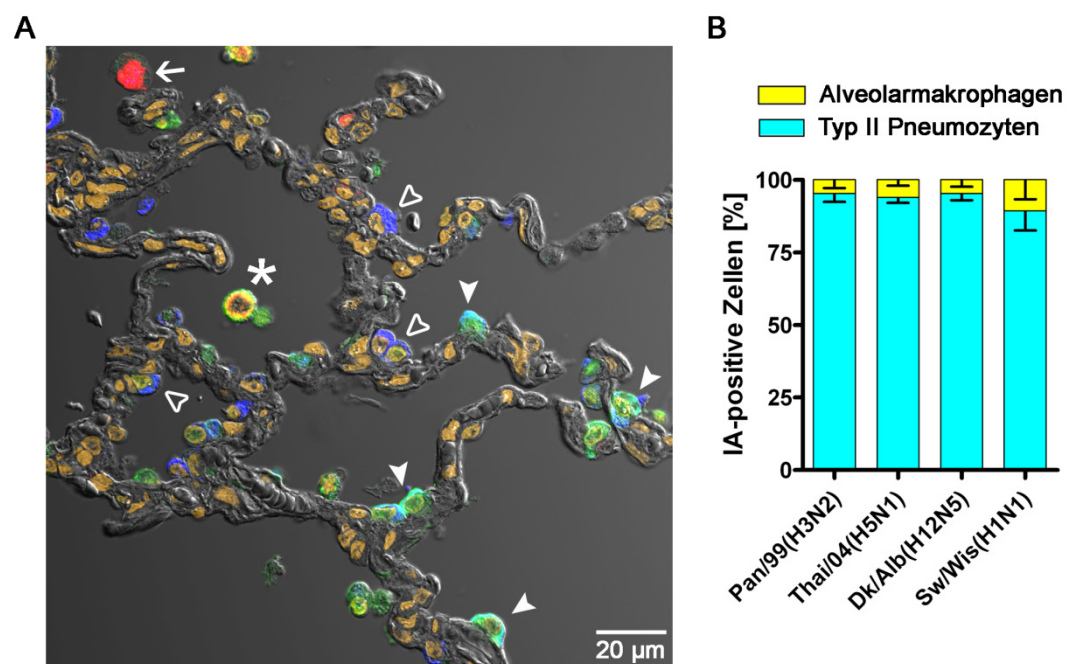


Abbildung 25: Quantifizierung Influenza A Virus infizierter Zellen.

Humane Lungengewebeproben wurden mit Pan/99(H3N2), Thai/04(H5N1), Dk/Alb(H12N5) oder Sw/Wis(H1N1) (4×10^5 pfu) für 24 h infiziert. Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben routinemäßig für die Immunhistologische Analyse aufbereitet. (A) Die Gewebeschnitte wurden gegen Influenza A-Antigen (grün), gegen proSP-C (blau) zur Darstellung von Typ II Pneumozyten [weiße Pfeilspitzen für infizierte Zellen (cyan); offene Pfeilspitzen für nicht infizierte Zellen (blau)] und gegen CD68 (rot) zur Darstellung von Alveolarmakrophagen [Stern für infizierte Zelle (gelb); weißer Pfeil für nicht infizierte Zelle (rot)] gefärbt. Die Zellkernfärbung mittels DAPI ist in Orange dargestellt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von 3 verschiedenen Patientenproben. (B) Mindestens 50 Influenza A-positive Zellen von Pan/99(H3N2), Thai/04(H5N1), Dk/Alb(H12N5) und Sw/Wis(H1N1) infizierten Proben wurden pro Patient ausgezählt und entweder als Typ II Pneumozyt oder Alveolarmakrophage identifiziert und gezählt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.2.5 Zelltropismus des neuen Influenza A(H7N9) Virus

Das neue Influenza A(H7N9) Virus wurde im März 2013 zum ersten Mal von schwer erkrankten Patienten in China isoliert. Klinische Studien zeigten, dass das in Vögeln niedrig-pathogene Virus im Menschen häufig eine schwere respiratorische Erkrankung mit schwerer Pneumonie und schwerem akuten Atemnotsyndrom (ARDS) hervorruft (Gao et al. 2013). Daher sollte Zelltropismus des humanen A(H7N9)-Isolats Anh/13(H7N9) in humanem Lungengewebe mittels Immunhistochemie untersucht werden, wobei zum Vergleich niedrig-pathogene aviäre Isolate vom Subtyp H7 mitgeführt wurden. Dabei zeigte sich, dass das Anh/13(H7N9) Virus, ebenso wie die zuvor getesteten saisonalen, pandemischen, porcinen und aviären Viren, fast ausschließlich Typ II Zellen infizierte, während Typ I Zellen nicht infiziert wurden. Auch die mitgeführten niedrig-pathogenen aviären Isolate Trk/Ger(H7N9) und Trk/It(H7N7) zeigten den gleichen Zelltropismus (Abbildung 26).

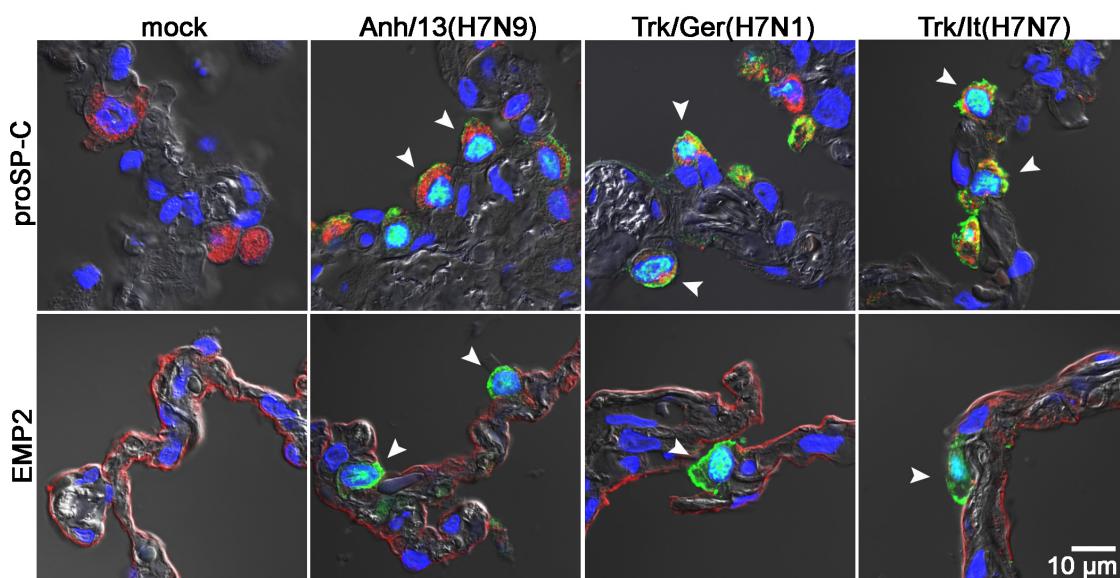


Abbildung 26: Zelltropismus des neuen Influenza A(H7N9) Virus und zweier aviärer Viren vom Subtyp H7N1 und H7N7 im Alveolarepithel.

Humane Lungengewebeproben wurden mock-infiziert oder mit den angegebenen Viren (4×10^6 pfu) für 24 h infiziert und für die immunhistologische Analyse aufbereitet. Die Gewebeschnitte wurden gegen Influenza A-Antigen (grün) und gegen proSP-C (rot) als Typ II Zellmarker oder gegen EMP2 (rot) als Typ I Zellmarker gefärbt. Influenza A-Antigen positive Typ II Zellen (weiße Pfeilspitze). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

3.2.6 Infektion fibrotischer Lungen durch saisonales H3N2 Virus

Chronische pulmonale Erkrankungen, wie z.B. die interstitielle Lungenfibrose sind bekannte Risikofaktoren für schwere Verläufe der Influenzavirusinfektion (Campbell et al. 2010; Nguyen-Van-Tam et al. 2010). Zugrunde liegende Mechanismen sind bisher kaum verstanden. Einige der für die Untersuchung des Zelltropismus verwendeten Lungenproben zeigten in der HE-Färbung für die interstitielle pulmonale Fibrose typische pathohistologische Veränderungen in der Lungenarchitektur, wie die fibrotische Verbreiterung der alveolaren Septen und eine Typ II Zellhyperplasie (Fernandez and Eickelberg 2012) (Abbildung 27A). Gemeinsam mit einem Facharzt für Pathologie wurden entsprechende, nach den diagnostischen Kriterien geeignete Proben ausgewählt. Gewebeschnitte Mock-infizierter Proben von drei Patienten mit pulmonaler Fibrose wurden gegen proSP-C als Typ II Zellmarker gefärbt (Abbildung 27B). Die positive proSP-C Färbung in den proliferierenden Zellen bestätigte die Typ II Zellhyperplasie.

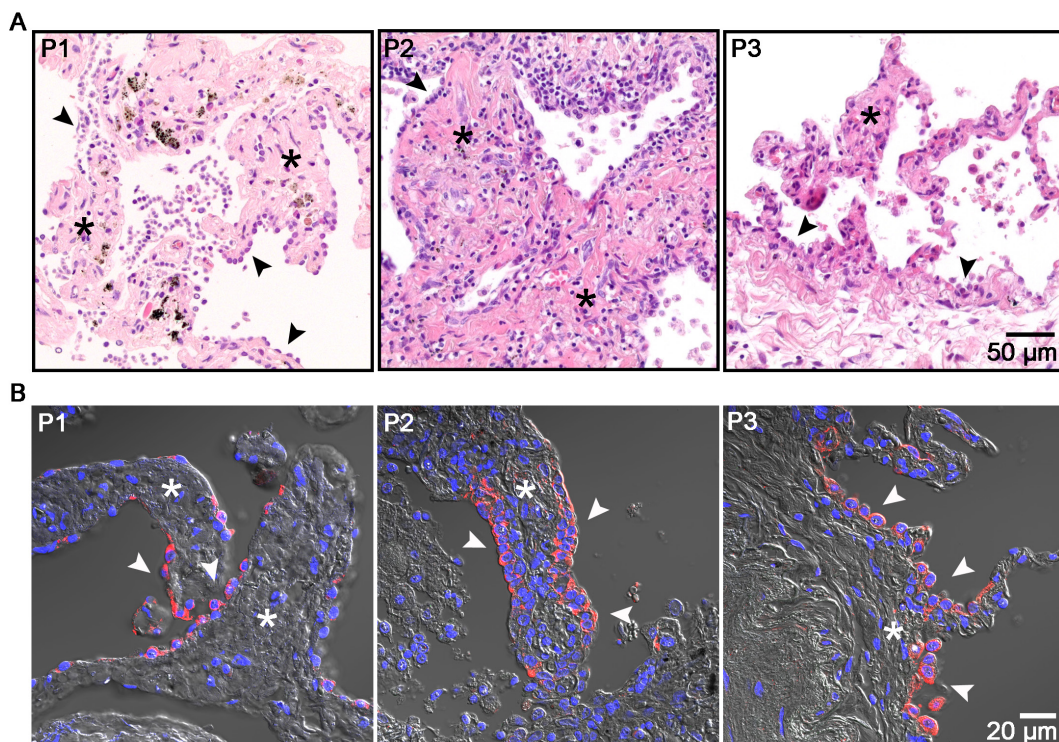


Abbildung 27: Typ II Zellproliferation in Lungengewebe von Patienten mit pulmonaler Fibrose.

(A) Die HE-Färbung von für 24 h Mock-infizierten Gewebeproben von 3 Patienten (P1-3) illustriert die typische Morphologie der interstitiellen pulmonalen Fibrose alveolarer Septen (Sternchen) und eine Typ II Zellproliferation (Pfeilspitze). (B) Die Typ II Zellproliferation in den entsprechenden Gewebeschnitten (P1-3) durch Immunfärbung gegen den Typ II Zellmarker proSP-C (Pfeilspitze) bestätigt. Fibrotische Areale (Sternchen). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht.

Die Färbung gegen proSP-C und gegen Influenza-A Antigen in Pan/99(H3N2)-infizierten Gewebeschnitten der entsprechenden Patientenproben zeigte einen starken viralen Tropismus für proliferierende Typ II Zellen in fibrotischem Lungengewebe (Abbildung 28).

Da bereits gezeigt wurde, dass Influenza A Viren fast ausschließlich in Typ II Zellen replizieren, kann die erhöhte Zahl an Typ II Zellen in fibrotischem Lungengewebe Ursache einer verstärkten viralen Replikation sein.

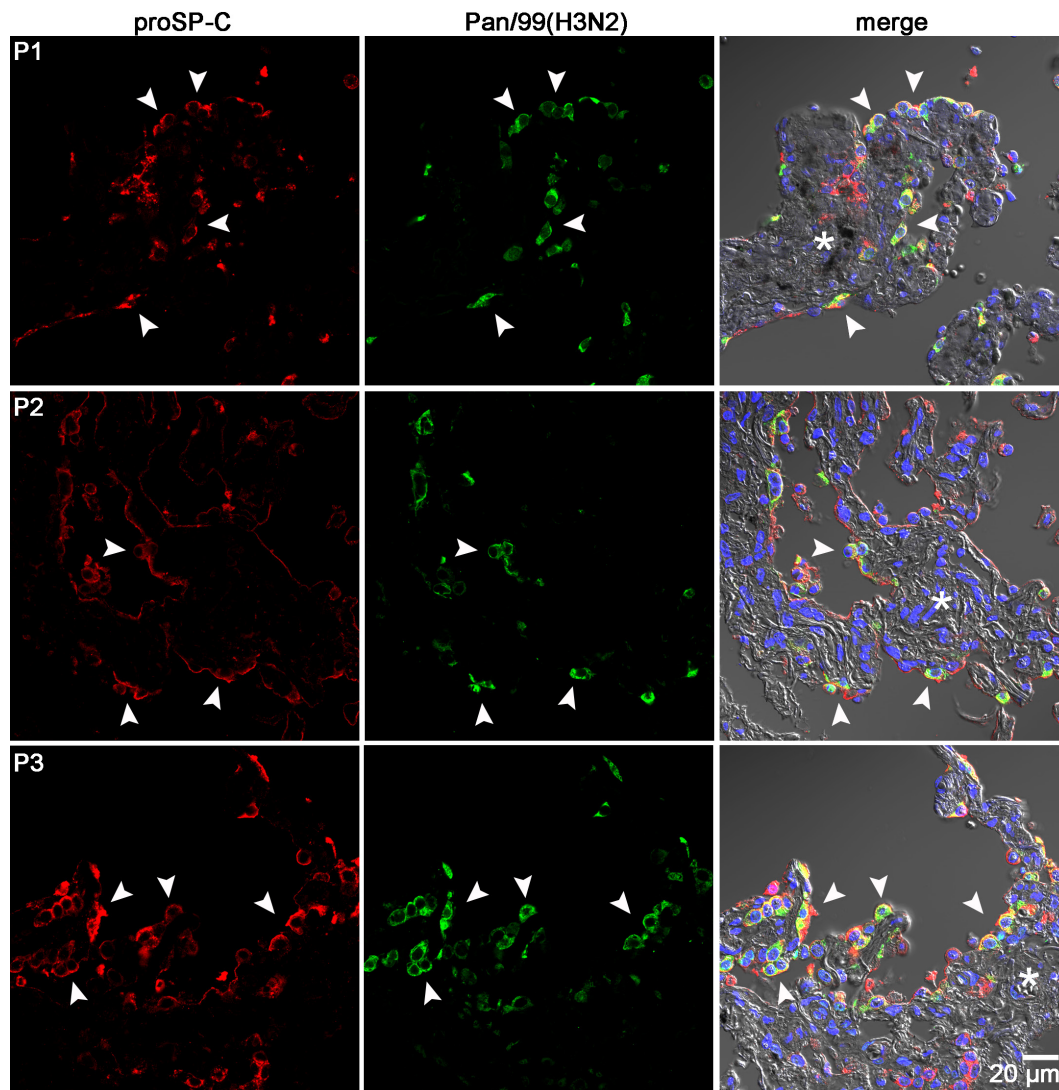


Abbildung 28: Infektion von humanem fibrotischen Lungengewebe durch saisonales H3N2 Virus.

Lungengewebe von 3 Patienten (P1-3) mit pulmonaler Fibrose wurde mit Pan/99(H3N2) für 24 h infiziert ($5 \cdot 10^6$ pfu) und für die immunhistologische Analyse aufbereitet. Die Gewebeschnitte wurden gegen Influenza A-Antigen (grün) und gegen proSP-C (rot) als Typ II Zellmarker gefärbt. Fibrotische Areale (Sternchen). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht.

3.2.7 Lebendgewebemikroskopie Influenzavirus-infizierter Alveolarepithelzellen

Die immunhistologischen Färbungen zum Zelltropismus der verschiedenen Influenzaviren zeigte, dass die Typ II Zellen die hauptsächlichen Zielzelle der Influenza Viren im unteren Respirationstrakt darstellt (Abbildung 25). Um das Schicksal Influenzavirus-infizierter Typ II Zellen direkt im alveolären Zellverband zu untersuchen, wurden Lungengewebebeobachten mit PR8 NS1-GFP(H1N1) Virus (Kuznetsova et al. 2014) infiziert. GFP-positive Zellen wurden dann mittels Lebendgewebemikroskopie über 36 h aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass infizierte Zellen in Apoptose gehen und sich aus dem alveolären Zellverband lösen (Abbildung 29). Dabei konnten typische morphologische Merkmale der Apoptose wie ein verringertes Zellvolumen mit abgerundeter Zellmorphologie sowie Ausstülpungen der Plasmamembran und apoptotische Körperchen beobachtet werden.

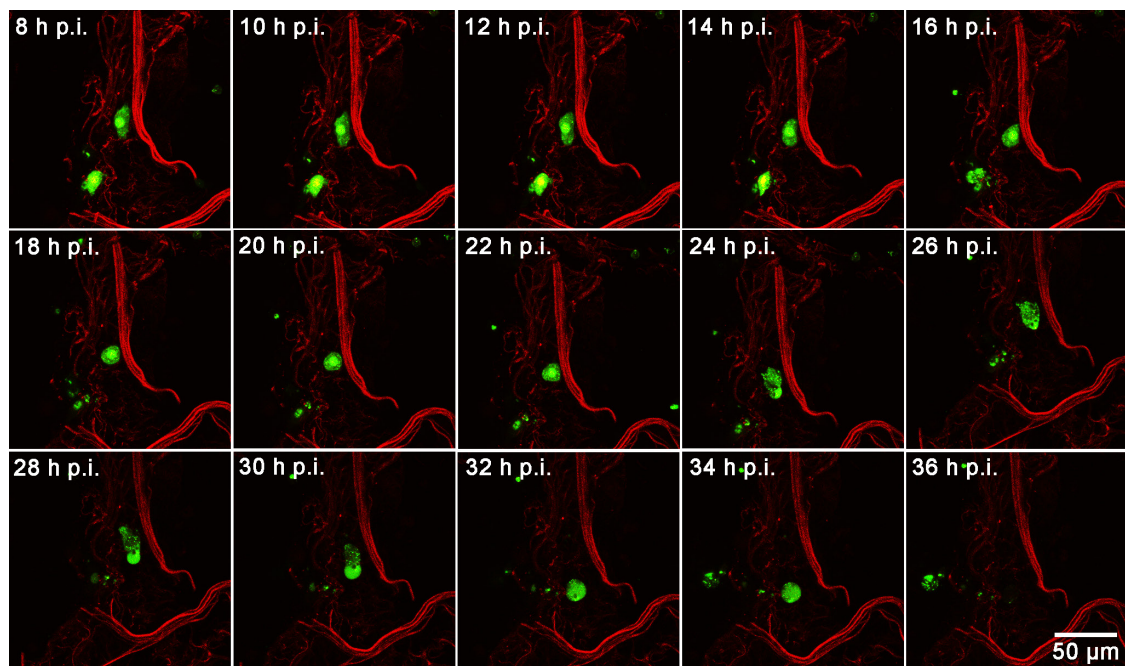


Abbildung 29: Live-Cell-Imaging Influenzavirus-infizierter Typ II Zellen im Gewebeverband.

Lungengewebe wurde mit dem PR8 NS1-GFP(H1N1) Virus infiziert. 8 h nach der Infektion wurden infizierte Zellen (grün, weiße Pfeilspitze) über 28 h mittels Live-Cell-Imaging aufgenommen. Dargestellte morphologische Merkmale der Apoptose sind die abgerundete Zellform (offene Pfeilspitze), Plasmaausstülpungen (weißer Pfeil) und apoptotische Körperchen (Stern). Die Autofluoreszenz ist in Rot dargestellt.

3.3 Infektionsverhalten des MERS Coronavirus in humanem Lungengewebe

Nach dem Auftreten des MERS-Coronavirus 2012 wurde das Infektionsverhalten eines MERS-CoV-Patientenisolates in *ex vivo* infiziertem humanem Lungengewebe untersucht. Dabei wurden neben dem Replikationsvermögen, ebenfalls der Zelltropismus, die Rezeptorexpression in der Lunge sowie die infektionsbedingte Schädigung des alveolaren Kompartimentes gezeigt.

3.3.1 Replikation und Antigennachweis im Gewebe

Da zu diesem Zeitpunkt keine kommerziellen Antikörper gegen das neue MERS-CoV erhältlich waren, wurden MERS-CoV-Patientenserum als spezifische Antiserum gegen virales MERS-CoV-Antigen getestet. Die Inkubation MERS-CoV-infizierter Gewebeschnitte mit zwei verschiedenen Patientenseren (Serum A und B) führte zu einem eindeutigen Signal in der Immunfluoreszenzfärbung, welches das gesamte Alveolarepithel umfasste. Nach Inkubation mit Serum eines gesunden Blutspenders (Kontrollserum) blieb das Fluoreszenzsignal auf Hintergrundniveau (Abbildung 30A). Die Färbung Mock-infizierter Gewebeschnitte sowohl mit beiden Patientenseren als auch mit Kontrollserum führte ebenfalls lediglich zu einem Fluoreszenzsignal auf Hintergrundniveau (Abbildung 30A). Dieses Ergebnis wurde für das Kontrollserum und das Patientenserum A in der Hellfeldfärbung zusätzlich bestätigt (Abbildung 30B).

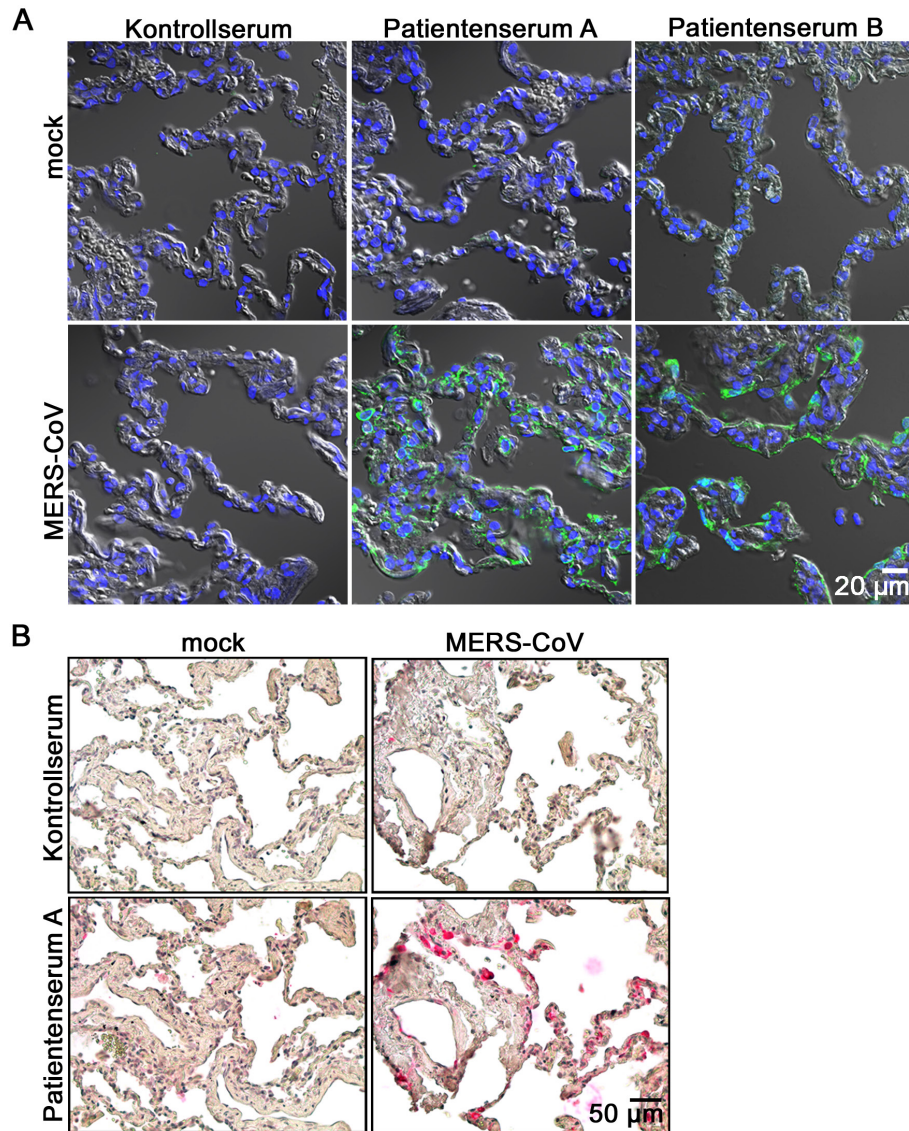


Abbildung 30: Immunhistologischer Nachweis von MERS-CoV viralem Antigen in infizierten Gewebeproben mittels Patientenserum.

Mock- und MERS-CoV-infiziertes (2×10^5 pfu) Lungengewebe wurde 24 h nach der Infektion fixiert und für die Immunhistologie aufbereitet. **(A)** Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Gewebeschnitte infizierter sowie mock-infizierter Proben mit Kontrollserum und zur Darstellung MERS-CoV Antigen-positiver Zellen (grün) mit 2 verschiedenen Patientenseren (A, B) gefärbt. Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht. **(B)** Für die Hellfeldmikroskopie wurden Gewebeschnitte infizierter sowie mock-infizierter Proben mit Kontrollserum und mit Patientenserum A gefärbt. MERS-CoV Antigen-positive Zellen (rot) wurden mittels Alkalischer Phosphatase Reaktion dargestellt. Zellkerne (blau) wurden mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind jeweils repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

Wie das hochpathogene H5N1 Influenzavirus wird auch MERS-CoV mit einer schweren Pneumonie und einem schwerem akuten Lungenschaden assoziiert. Auch die hohe Lethalität dieses Virus von ca. 50% ist ähnlich zu hochpathogenen H5N1 Influenzaviren. Daher wurde

die Replikation beider Viren in humanem Lungengewebe verglichen (Abbildung 31A). Der Verlauf beider Replikationskurven war sehr ähnlich. Beide Viren replizierten sehr effizient im Lungengewebe. Für das Thai/04 (H5N1) Virus war ein Anstieg des Titters um 3 Log-Stufen innerhalb von 48 h zu beobachten. Das MERS-CoV replizierte innerhalb dieses Zeitraumes zu einem Titer, welcher nur ca. 0,5 Log-Stufen tiefer lag. Immunfärbung MERS-CoV und Thai/04 (H5N1) koinfizierter Gewebeschnitte gegen MERS-CoV und Influenza A virales Antigen zeigte eine umfassende Infektion des Alveolarepithels durch MERS-CoV, während das hochpathogene Thai/04 (H5N1) Virus lediglich Typ II Zellen infizierte (Abbildung 31B), wie bereits unter 3.2.4 gezeigt.

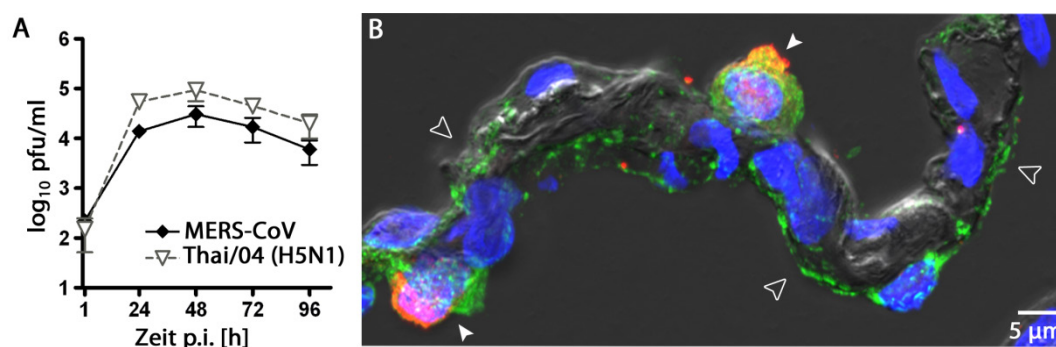


Abbildung 31: Vergleich der Replikationskurven und der Antigenverteilung im Alveolarepithel von MERS-CoV und Thai/04 (H5N1).

(A) Humanes Lungengewebe wurde mit MERS-CoV oder Thai/04 (H5N1) (je 2×10^5) infiziert. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten genommenen Überstände wurden mittels Plaque Assay auf Verozellen (MERS-CoV) oder MDCK-Zellen (Thai/04 (H5N1)) titriert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von Duplikaten aus 4 unabhängigen Experimenten. (B) Humanes Lungengewebe wurde für 24 h mit MERS-CoV und Thai/04 (H5N1) koinfiziert. Virales Antigen wurde mit MERS-CoV Antiserum (Patientenserum A) (grün) und mit einem Influenza A-spezifischen Antikörper (rot) angefärbt. MERS-CoV infizierte Zelle (offene Pfeilspitze); MERS-CoV und Thai/04 (H5N1) infizierte Zelle (weiße Pfeilspitze). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von 3 verschiedenen Patientenproben. (Bild (A): Jessica von Recum)

3.3.2 Zelltropismus

Um den Zelltropismus des MERS-CoV im unteren Respirationstrakt genauer zu charakterisieren, wurden im Folgenden systematische Doppelfärbungen *ex vivo* infizierter Gewebeschnitte gegen MERS-CoV und Zelltypmarker durchgeführt. Dabei wurde das virale Antigen sowohl in Typ II als auch in Typ I Zellen nachgewiesen. Virales Antigen konnte häufig auf der Zelloberfläche von Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden, welche sich in der Nähe infizierter Epithelzellen befanden (Abbildung 32). Die intrazelluläre Detektion des viralen Antigens in Alveolarmakrophagen war jedoch extrem selten.

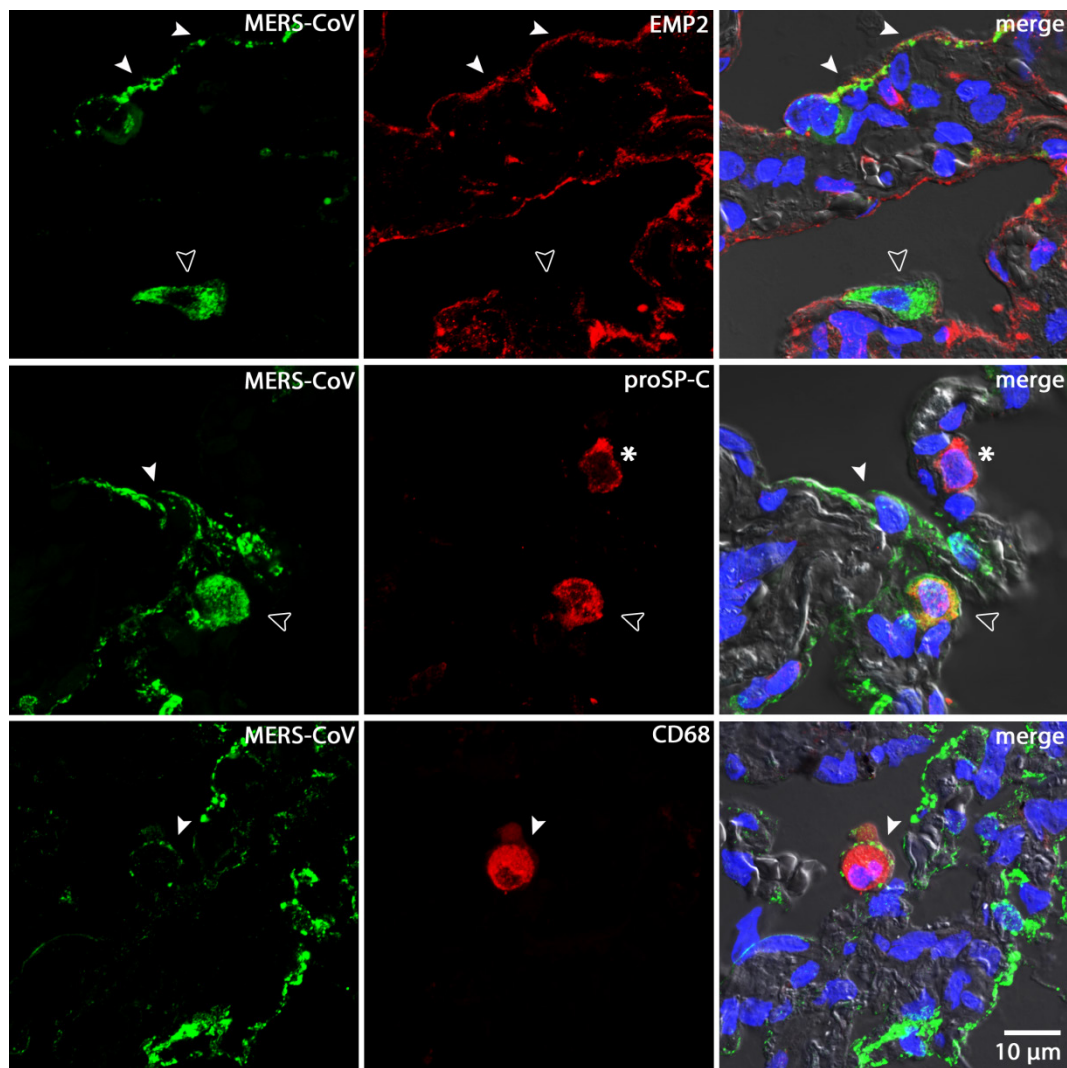


Abbildung 32: Immunhistologischer Nachweis von MERS-CoV-Antigen in Typ I und Typ II Zellen.

Humanes Lungengewebe wurde für 24 h mit MERS-CoV infiziert (2×10^5 pfu) und für die immunhistologische Analyse aufbereitet. Virales Antigen wurde mit MERS-CoV-Antiserum (Patientenserum A) (grün) angefärbt. Typ I Zellen (weiße Pfeilspitze), Typ II Zellen (offene Pfeilspitze) und Alveolarmakrophagen (weiße Pfeilspitze) wurden mit einem spezifischem Antikörper gegen den jeweils entsprechenden Zellmarker EMP2, proSP-C und CD68 (rot) angefärbt. Nicht-infizierte Typ II Zelle (Stern). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

Virales Antigen konnte weiterhin im Bronchialepithel nachgewiesen werden, wobei sowohl zilierttragende als auch nicht zilierttragende Zellen betroffen waren (Abbildung 33A, B). Das Bronchialepithel wurde anhand seiner typischen Morphologie identifiziert. Zudem wurde zusätzlich gegen Pan-Cytokeratin als Epithelzellmarker gefärbt.

Doppelfärbungen gegen virales Antigen und den Endothelzellmarker Von Willebrand Faktor zeigten, dass zudem sowohl große als auch kleine pulmonale Gefäße infiziert wurden (Abbildung 33C, D).

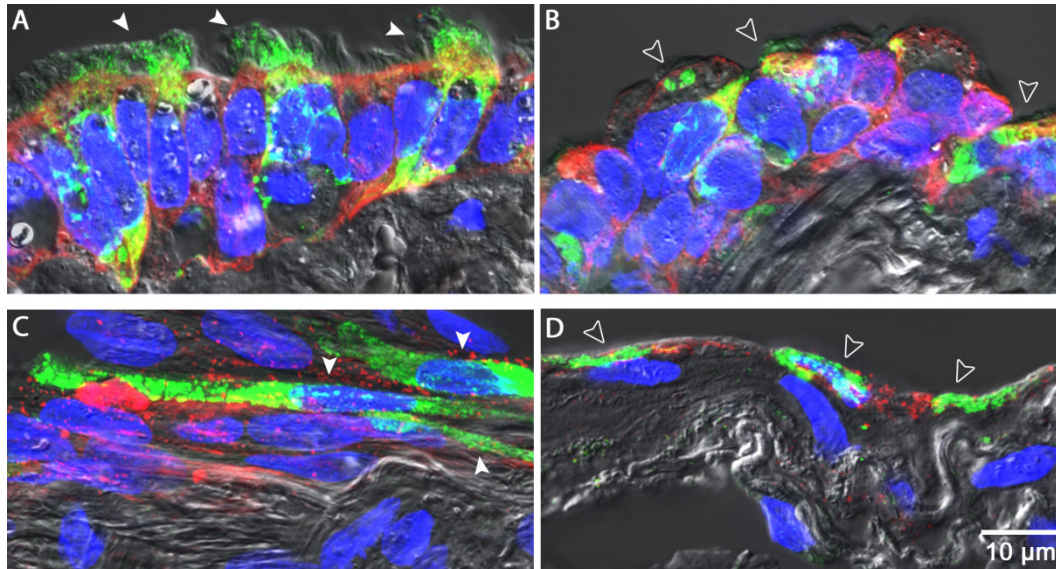


Abbildung 33: Immunhistologischer Nachweis von MERS-CoV-Antigen in Bronchial- und Endothelzellen.

Humanes Lungengewebe wurde für 24 h mit MERS-CoV infiziert (2×10^5 pfu) und für die Immunhistologie aufbereitet. Virales Antigen wurde mit MERS-CoV-Antiserum (Patientenserum A) (grün) angefärbt. (A, B) Zilientragende (weiße Pfeilspitze) und nicht-zilientragende Bronchialepithelzellen (offene Pfeilspitze) wurden mit spezifischem Antikörper gegen Pan-Cytokeratin (rot) angefärbt. (C, D) Endothelzellen in großen (weiße Pfeilspitze) und kleinen Gefäßen (offene Pfeilspitze) wurden mit spezifischem Antikörper gegen Pan-Cytokeratin (rot) angefärbt. Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

3.3.3 Rezeptorexpression

Die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) wurde als funktioneller Rezeptor des MERS-CoV identifiziert (Raj et al. 2013). Da bisher keine Daten bezüglich der DPP4-Expression im unteren Respirationstrakt des Menschen vorlagen, sollte die Rezeptorexpression in humanen Lungenproben mittels Immunhistochemie charakterisiert werden. Durch die Färbung infizierter Gewebeschnitte konnte der Rezeptor dabei zunächst in MERS-CoV-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 34A). Die Färbung nicht infizierter Schnitte gegen DPP4 alleine oder in Kombination mit spezifischen Zellmarkern zeigte eine ubiquitäre DPP4-Expression im unteren Respirationstrakt des Menschen. Die Expression von DPP4 konnte

sowohl in zilientragenden (Abbildung 34B) als auch in nicht-zilientragenden (Abbildung 34C) Bronchialepithelzellen und in Endothelzellen (Abbildung 34D) nachgewiesen werden.

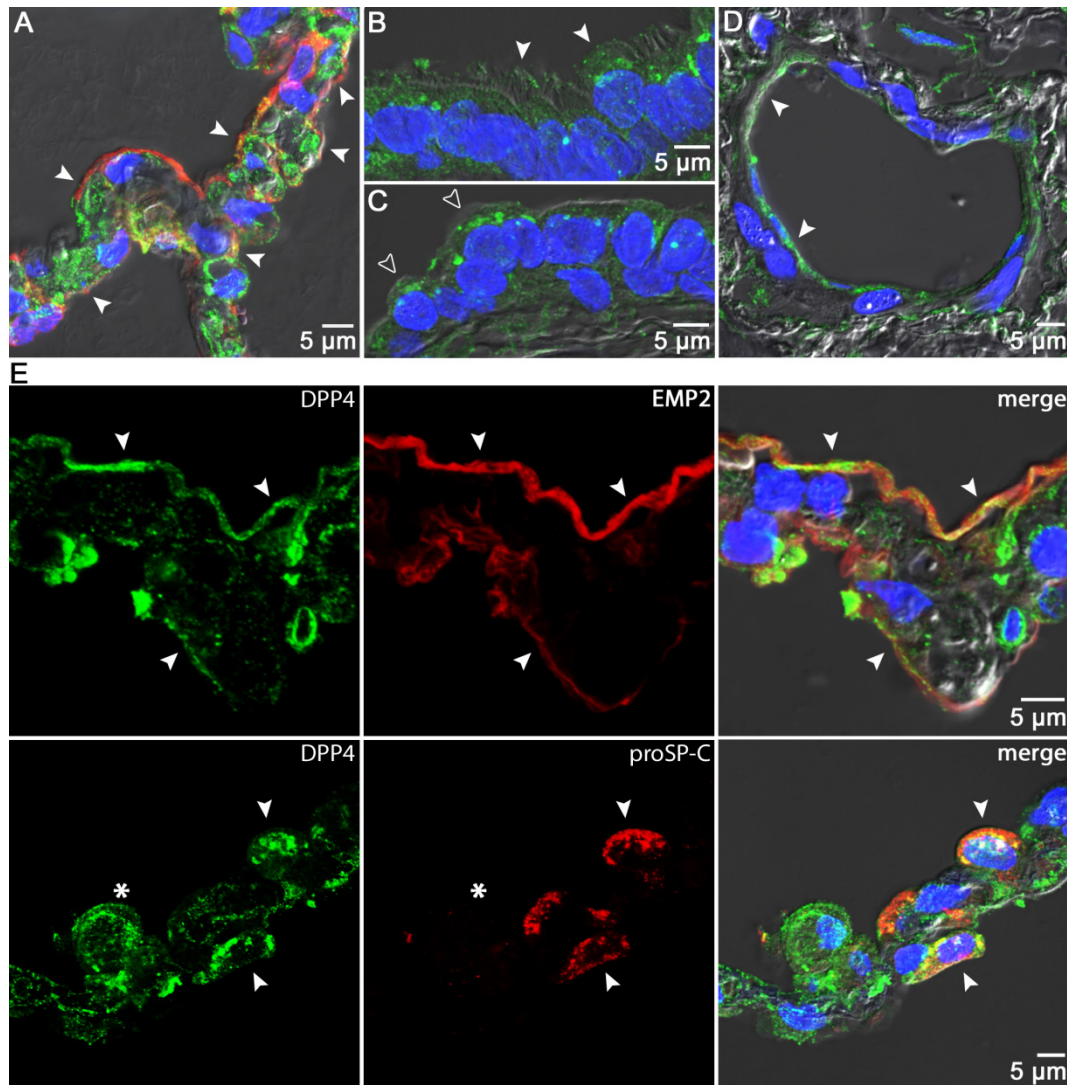


Abbildung 34: DPP4 Expression im unteren Respirationstrakt.

(A) Humanes Lungengewebe wurde für 24 h mit MERS-CoV infiziert (2×10^5 pfu) und für die Immunhistologie aufbereitet. Die Gewebeschnitte wurden gegen MERS-CoV-Antigen (grün) und gegen DPP4 (rot) gefärbt. MERS-CoV infizierte und DPP4-positive Zellen (weiße Pfeilspitze). In nicht infizierten Gewebeproben wurde DPP4 (grün) mittels Immunhistochemie auf (B) zilientragenden (weiße Pfeilspitze), (C) nicht-zilientragenden Zellen (offene Pfeilspitze) und auf (D) Endothelzellen (weiße Pfeilspitze) nachgewiesen. (E) Die Gewebeschnitte nicht infizierter Proben wurden gegen DPP4 (grün) und EMP2 als Typ I Zellmarker (rot) oder proSP-C als Typ II Zellmarker (rot) gefärbt. MERS-CoV infizierte und Zellmarker-positive Zelle (weiße Pfeilspitze). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) visualisiert. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von 3 verschiedenen Patientenproben.

Zilien- und nicht-zilientragendes Bronchialepithel sowie das Endothel wurden hierbei anhand der typischen Morphologie identifiziert. Die Färbung gegen DPP4 in Kombination mit EMP2 als Typ I Zellmarker oder proSP-C als Typ II Zellmarker zeigte eine DPP4-Expression in Typ I und Typ II Zellen (Abbildung 34E). Auch Alveolarmakrophagen zeigten eine deutliche Rezeptorexpression (Abbildung 35).

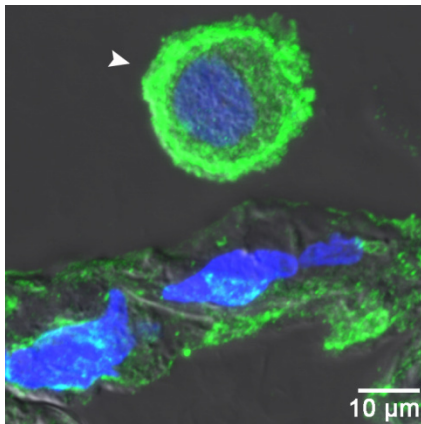


Abbildung 35: DPP4-Expression auf Alveolarmakrophagen.

Gewebeschnitte nicht-infizierter Proben wurden gegen DPP4 (grün) gefärbt. Alveolarmakrophage (weiße Pfeilspitze). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) sichtbar gemacht. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von 3 verschiedenen Patientenproben.

3.3.4 MERS-CoV induzierte Apoptose und alveolärer Schaden

In Gewebeschnitten infizierter Proben wurden mittels Immunhistochemie freie, vom Alveolarepithel abgelöste Zellen detektiert. Doppelfärbungen gegen spezifische Zellmarker zeigten, dass es sich hierbei um abgelöste Typ II Zellen (Abbildung 36A) und nicht um Alveolarmakrophagen (Abbildung 36B) handelte. Zudem konnten immunhistochemisch Epithelzellen nachgewiesen werden, welche sich im Ablösungsprozess aus dem Zellverband des Alveolarepithels befanden, was mit der Unterbrechung des Occludinbandes einherging (Abbildung 36C, D). Die infizierten, sich ablösenden Zellen (Abbildung 36E) zeigten zudem morphologische Kennzeichen der Apoptose wie Kernfragmentierung, Chromatinkondensation (Abbildung 36F) und zytoplasmatische Ausstülpungen (Abbildung 36G).

Zudem wurden Zytospins einer Bronchioalveolären Lavage (BAL) eines MERS-CoV-infizierten Patienten gegen virales Antigen und verschiedene Zellmarker gefärbt (Abbildung 37).

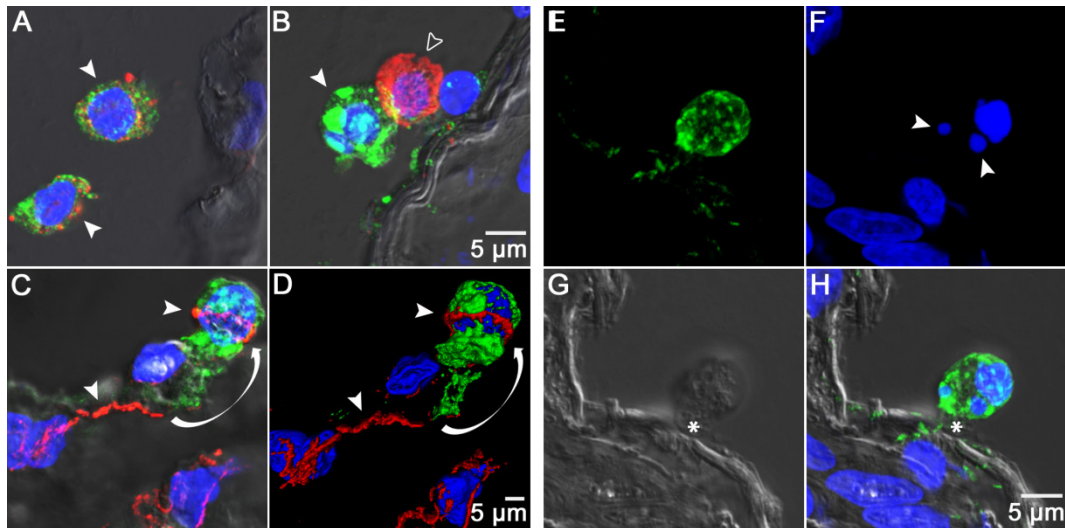


Abbildung 36: Apoptose und Ablösung MERS-CoV infizierter Alveolarepithelzellen aus dem Gewebeverband.

Humanes Lungengewebe wurde für 24 h mit MERS-CoV infiziert (2×10^5 pfu) und für die Immunhistologie aufbereitet. **(A)** Die Gewebeschnitte wurden mit MERS-CoV Antiserum (grün) und Antikörper gegen proSP-C (rot) als Typ II Zellmarker oder **(B)** CD68 (rot) als Marker für Alveolarmakrophagen gefärbt. Infizierte abgelöste Epithelzellen (weiße Pfeilspitze); Alveolarmakrophage (offene Pfeilspitze). **(C)** Ablösung einer MERS-CoV-infizierten Epithelzelle (grün) aus dem Alveolarepithel mit einhergehender Unterbrechung (weißer Pfeil) der umschließenden Occludinstruktur (rot) (weiße Pfeilspitze). **(D)** Dreidimensionale Rekonstruktion von (C). **(E)** MERS-CoV-infizierte Alveolarepithelzelle (grün) zeigt **(F)** Chromatinkondensation und Kernfragmentierung (weiße Pfeilspitze) sowie **(G)** zytoplasmatische Ausstülpungen (Sternchen) als morphologische Kennzeichen der Apoptose. **(H)** merge (E, F, G). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) visualisiert.

Unter den dabei nachgewiesenen MERS-CoV-infizierten (Abbildung 37A) Leukozyten (Abbildung 37B), befanden sich unter anderem neutrophile Granulozyten, welche anhand der charakteristischen Segmentierung ihres Zellkerns identifiziert werden konnten (Abbildung 37C, D). Auch in den infizierten Leukozyten wurden typische morphologische Zeichen der Apoptose, wie Kernfragmentierung und Chromatinkondensation beobachtet (Abbildung 37C, D). Außerdem konnten, analog zum *ex vivo* Infektionsmodell in humanem Lungengewebe, abgelöste MERS-CoV-infizierte (Abbildung 37E) Epithelzellen nachgewiesen werden, bei denen es sich um Typ II Zellen handelte (Abbildung 37F) und bei denen ebenfalls eine Kernfragmentierung und Chromatinkondensation sichtbar war (Abbildung 37G).

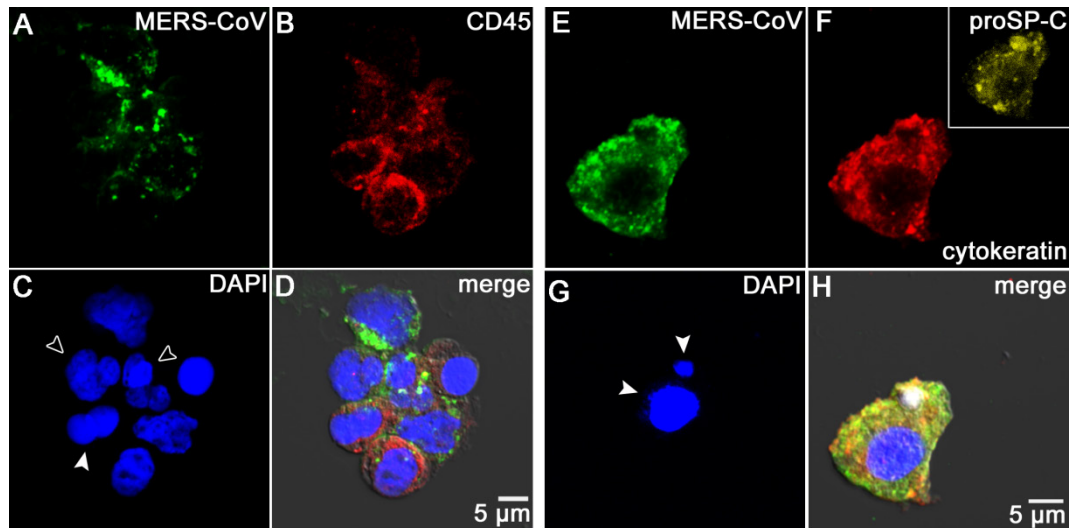


Abbildung 37: Morphologische Kennzeichen der Apoptose in MERS-CoV-infizierten Zellen aus der BAL eines MERS-CoV-infizierten Patienten.

(A) Fixierte Zytospins einer BAL eines MERS-CoV-infizierten Patienten wurden mit MERS-CoV Antiserum (grün) und Antikörper gegen (B) CD45 (rot) als Leukozytenmarker gefärbt. (C) Identifizierung neutrophiler Granulozyten anhand der charakteristischen Segmentierung des Zellkerns (offene Pfeilspitze). Infizierter Leukozyt zeigt Chromatinkondensation und Kernfragmentierung (weiße Pfeilspitze) als morphologische Kennzeichen der Apoptose. (D) merge A, B, C. (E) Fixierte Zellen wurden mit MERS-CoV Antiserum (grün) und Antikörper gegen (F) Pan-Cytokeratin (rot) als Epithelzellmarker und proSP-C (gelb) als Typ II Zellmarker gefärbt. (G) Infizierte Typ II Zelle zeigt Chromatinkondensation und Kernfragmentierung (weiße Pfeilspitze) als morphologische Kennzeichen der Apoptose. (H) merge (E, F, G). Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Gewebestruktur wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrast (DIC) dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von *ex vivo* kultiviertem Lungengewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues *ex vivo* Infektionsmodell der humanen Lunge etabliert. Um die Vitalität und den strukturellen Erhalt des Gewebes während der *ex vivo* Kultivierung zu beurteilen, wurde die Gewebemorphologie, die Zytotoxizität und die Apoptoserate über 72 h untersucht. Bei der mikroskopischen Beurteilung HE-gefärbter Gewebeschnitte zeigte sich, dass die Integrität des alveolären Zellverbandes und die Kernmorphologie über 72 h Kultivierung weitestgehend erhalten bleibt.

Die über die LDH-Freisetzung gemessene Zytotoxizität im kultivierten Lungengewebe steigt nach 72 h auf ca. 20% an. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Zytotoxizität von 15%, welche über 72 in *ex vivo* kultivierten 250 µm dicken Precision Cut Lung Slices (PCLS) gemessen wurde (Martin et al. 1996; Wohlsen et al. 2003). PCLS gewährleisten durch ihre große Oberfläche im Verhältnis zum Gewebevolumen während der Kultivierung eine sehr gute Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs fällt auf, dass die Zytotoxizität innerhalb der ersten 15,5 h auf 15% ansteigt, wobei der Anstieg um die restlichen 5% innerhalb der folgenden 56,5 h viel langsamer verläuft. Diese frühe starke LDH-Freisetzung wurde ebenfalls bei der Kultivierung von PLCS in einer früheren Studie beobachtet (Martin et al. 1996) und ist vermutlich auf die vorrausgegangene Gewebepräparation zurückzuführen, welche durch das Schneiden des Gewebes mit einer mechanischen Zellschädigung einhergeht. Die später folgende LDH-Freisetzung verläuft unter den gewählten Bedingungen dann auf einem viel niedrigeren Niveau.

Zur Beurteilung der Apoptoserate über die Zeit in *ex vivo* kultiviertem Gewebe wurden aktivierte Caspase 3-positive Zellen mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert. Die Aktivierung dieser Effektorcaspase gilt als Apoptosemarker (Gown and Willingham 2002; Duan et al. 2003). Die Apoptoserate stieg alle 24 h relativ konstant um ca. 3% an, so dass sie nach 72 h Kultivierung ca. 9% betrug. Die Quantifizierung über aktivierte Caspase 3-positive Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten erfasst allerdings jeweils nur die in jenem Moment im apoptotischen Prozess befindlichen Zellen, wobei die bereits untergegangenen Zellen nicht zur Darstellung kommen. Um eine Annäherung an die Gesamtzahl der untergegangenen Zellen zu erhalten, wurden die gemittelten Zahlen der Zellkerne, welche pro Bild zu den entsprechenden Zeitpunkten detektiert wurden, verglichen. Dies ergab eine Abnahme der

Zellkerne um 35% über 72 h. Die Zahl der Zellkerne nahm dabei innerhalb der ersten 24 h sehr schnell ab, sank jedoch im weiteren Verlauf weniger schnell. Dies stimmt mit dem Verlauf der Zytotoxizitätskurve überein. Die Zytotoxizität stieg innerhalb der ersten 24 h schnell auf ca. 15% an, wobei der Anstieg um weitere 5% während der restlichen 48 h langsamer verlief. Die rasche Abnahme der Zellkernzahl innerhalb der ersten 24 h ist vermutlich ebenso wie die in diesem Zeitraum festgestellte Freisetzung von LDH auf die Gewebepräparation zurückzuführen. Da die Apoptoserate relativ konstant alle 24 h um ca. 3% anstieg, lässt sich vermuten, dass die in dem frühen Zeitraum der Kultivierung beobachtete schnelle Abnahme der Zellkernzahl und rasche Zunahme der LDH-Freisetzung durch nekrotischen Zelltod verursacht worden sein könnte.

Der 30%ige Anstieg apoptotischer Zellen im Gewebe, welcher gegenüber der unbehandelten Kontrolle 24 h nach Stimulation mit dem starken Apoptoseinduktor Staurosporin beobachtet wurde, ließ sich durch vorherige Zugabe des Pan-Caspase Inhibitors zVAD-FMK vollständig verhindern. Dies zeigt, dass die hier verwendete Gewebekultur reaktive Zellen enthält, welche Stimulanzen aufnehmen können und auf diese reagieren. Die gleichmäßige Verteilung apoptotischer Zellen im Gewebe nach Stimulation mit Staurosporin sowie der gleichmäßige Aufhebungseffekt durch die Zugabe von zVAD-FMK zeigen außerdem, dass sich die zugegebenen Substanzen durch Diffusion gleichmäßig in dem dreidimensionalen Gewebeverband verteilen.

Fußend auf diesen Beobachtungen wurde davon ausgegangen, dass unter den gewählten Bedingungen für 72 h stabile experimentelle Verhältnisse bezüglich der Gewebevitalität bestehen.

4.2 Replikationsverhalten saisonaler, pandemischer, aviärer und porciner Influenzaviren

Alle getesteten Influenzaviren zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit in humanem Lungengewebe. Während das saisonale H3N2 und das hochpathogene H5N1 Virus sehr effizient replizierten, zeigten das niedrigpathogene aviäre und das porcine Virus eine deutlich geringere Replikationseffizienz. Das pandemische H1N1 Virus von 2009 replizierte ähnlich effizient wie ein saisonales H1N1 Virus. Die effiziente Replikation des H5N1 Virus korreliert mit der hohen Viruslast, welche in der Lunge von Patienten mit H5N1-Infektion (Sirinonthanawech et al. 2011) und Primaten detektiert wurde (Rimmelzwaan et al. 2001; Baskin et al. 2009), welche mit dem H5N1 Virus infiziert waren.

Die eher schlechte Replikationseffizienz des niedrig-pathogenen aviären und des porcinen Virus stimmen mit der niedrigen Pathogenität der meisten aviären Influenzaviren im Menschen (Beare and Webster 1991) und der extrem geringen Zahl an Patienten mit porciner Influenzavirusinfektion (Myers et al. 2007) überein.

4.3 Rezeptorexpression und -verteilung im unteren Respirationstrakt

Mit Hilfe der Lektine *Sambucus Nigra* Agglutinin (SNA) und *Maackia Amurensis* Agglutinin (MAA) wurde die Expression der viralen Rezeptoren in humanem Lungengewebe bereits durch eine Vielzahl von Studien untersucht. Die Ergebnisse sind jedoch weitgehend inkonsistent (Tabelle 28). So zeigten beispielsweise Matrosovich et al., dass nicht-zilientragende Zellen in kultiviertem humanen tracheobronchialen Epithelzellen SA α 2,6Gal- und keine SA α 2,3Gal-Rezeptoren exprimieren. Umgekehrt konnten SA α 2,3Gal-Rezeptoren auf zilientragenden Zellen, dafür aber auf nicht auf nicht-zilientragenden Zellen nachgewiesen werden (Matrosovich et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeigte Shinya et al. SA α 2,3Gal-Rezeptorexpression auf nicht-zilientragenden Bronchialepithelzellen (Shinya et al. 2006). Ibricevic et al. konnte sowohl eine SA α 2,3Gal- als auch eine SA α 2,6Gal-Rezeptorexpression auf zilientragenden Zellen detektieren (Ibricevic et al. 2006). Und schließlich fand Nicholls et al. die Expression von SA α 2,6Gal- und SA α 2,3Gal-Rezeptoren auf zilien- und nicht-zilientragenden Zellen (Nicholls et al. 2007). Ebenso verhält es sich mit den Ergebnissen zur Rezeptorverteilung im Alveolarepithel. Während einige Studien die Expression beider Rezeptoren auf Zellen im Alveolarepithel indizieren (Shinya et al. 2006; Nicholls et al. 2007), differenzieren andere Arbeiten zwischen Typ I und Typ II Zellen. So kommt man in einer Studie zu dem Ergebnis, dass SA α 2,3Gal-Rezeptoren ausschließlich auf Typ II Zellen exprimiert werden, während SA α 2,6Gal-Rezeptoren weder auf Typ I noch Typ II Zellen vorkommen (Ibricevic et al. 2006). Eine andere Studie fand ebenfalls die ausschließliche Expression von SA α 2,3Gal-Rezeptoren auf Typ II Zellen, jedoch mit einer diffusen Verteilung der SA α 2,6Gal-Rezeptoren im Alveolarepithel (Yao et al. 2008). Barkhordari publizierte wiederum, dass beide Rezeptoren sowohl auf Typ I als auch auf Typ II Zellen exprimiert werden (Barkhordari et al. 2004).

Tabelle 28: Zusammenfassung publizierter Studien zur Influenza A Rezeptorexpression in der humanen Lunge

Region	MAA-Bindung (SAα2,3Gal)	SNA-Bindung (SAα2,6Gal)	Publikation
Nasopharynx	-	-	Matrosovich et al. 2004
Trachea/Bronchus	primäre zilientragende Epithelzellen	primäre nicht-zilientragende Epithelzellen (stark)	
Alveolus	-	-	
Nasopharynx	-	-	Barkhordari et al. 2004
Trachea/Bronchus	Epithelzellen, Endothelzellen	Epithelzellen, Endothelzellen	
Alveolus	Typ I Zellen, Typ II Zellen, Alveolarmakrophagen, Endothelzellen	Typ I Zellen, Typ II Zellen, Alveolarmakrophagen, Endothelzellen	
Nasopharynx	Epithelzellen (gelegentlich)	Epithelzellen (stark)	Shinya et al. 2006
Trachea/Bronchus	nicht-zilientragende Epithelzellen	Epithelzellen	
Alveolus	Typ II Zellen	Alveolarepithelzellen	
Nasopharynx	-	-	Ibricevic et al. 2006
Trachea/Bronchus	zilientragende Epithelzellen	zilientragende Epithelzellen, Becherzellen	
Alveolus	Typ II Zellen	keine Detektion	
Nasopharynx	Epithelzellen (MAA1)	Epithelzellen (stark)	Nicholls et al. 2007
Trachea/Bronchus	zilientragende & nicht-zilientragende Zellen (MAA1)	zilientragende & nicht-zilientragende Zellen (stark)	
Alveolus	Alveolarepithelzellen (MAA2), Alveolarmakrophagen (MAA1)	Alveolarepithelzellen, Alveolarmakrophagen (minimal)	
Nasopharynx	zilientragende & nicht-zilientragende Zellen (gelegentlich)	zilientragende & nicht-zilientragende Zellen, Endothelzellen	Yao et al. 2008
Trachea/Bronchus	zilientragende & nicht-zilientragende Zellen, Endothelzellen (gelegentlich)	zilientragende & nicht-zilientragende Zellen, Endothelzellen	
Alveolus	Typ II Zellen, Endothelzellen	Alveolarepithelzellen, Endothelzellen	
Nasopharynx	-	-	Weinheimer et al. 2012
Trachea/Bronchus	Bronchialepithel	Bronchialepithel	
Alveolus	Typ I Zellen, Typ II Zellen, Alveolarmakrophagen	Typ I Zellen, Typ II Zellen, Alveolarmakrophagen	

Auf Grund der zum Teil deutlich unterschiedlichen Ergebnisse vorheriger Studien zum Rezeptorbesatz in der humanen Lunge wurden in dieser Studie Lektinfärbungen mittels *Sambucus Nigra* Agglutinin (SNA) und *Maackia Amurensis* Agglutinin durchgeführt, um die Expression der SA α 2,6Gal- und SA α 2,3Gal-Rezeptoren im unteren Respirationstrakt zu beschreiben. Zudem sollte der in dieser Studie gezeigte Zelltropismus der unterschiedlichen Influenzaviren in der humanen Lunge systematisch mit dem hier detektierten Rezeptorexpressionsmuster verglichen werden.

Sowohl der aviäre (SA α 2,3Gal) als auch der humane Influenza Virus Rezeptor (SA α 2,6Gal) konnten, wie bereits beschrieben (Barkhordari et al. 2004), im gesamten unteren Respirationstrakt auf Zellen des Bronchialepithels, auf Alveolarmakrophagen sowie auf Typ I und Typ II Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 17, Abbildung 18). Während nach vorherigem Verdau mit Neuraminidase die SNA Bindung vollständig verhindert werden

konnte, war für die MAA Bindung lediglich eine Abschwächung zu beobachten (Abbildung 17). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das verwendete MAA von EY Laboratories aus einer Kombination der beiden Isoformen MAA1 und MAA2 besteht. Beide binden SA α 2,3Gal, unterscheiden sich jedoch in ihrer Affinität zu den inneren Zuckerbestandteilen. Während MAA1 vorrangig an SA α 2,3Gal bindet, welches über eine β 1,4-Bindung an N-Acetylglucosamin (GlcNAc) gebunden ist (Wang and Cummings 1988; Knibbs et al. 1991), detektiert MAA2 SA α 2,3Gal, welches über eine β 1,3-Bindung mit N-Acetylgalactosamin (GalNAc) verknüpft ist (Konami et al. 1994). Neben SA α 2,3Gal bindet MAA1 zusätzlich an Zuckerstrukturen mit einem Sulphatrest (Nicholls et al. 2007), was die Restbindung des MAA nach dem Neuraminidaseverdau erklärt. Aus diesem Grund wurde in vielen Studien vor allem die MAA2 Isoform verwendet. So zeigte z.B. Shinya et al. 2006, unter Verwendung von MAA2 die Expression von SA α 2,3Gal vor allem in den terminalen respiratorischen Bronchiolen und im Alveolarepithel, während es in den oberen Atemwegen kaum detektierbar war (Shinya et al. 2006). Dies wurde als rationale Erklärung für die ineffiziente Mensch-zu-Mensch-Übertragung und die effiziente Replikationsfähigkeit des hochpathogenen H5N1 Virus vor allem im unteren Respirationstrakt des Menschen angenommen. Es wurde jedoch gezeigt, dass aviäre Viren sowohl an SA α 2,3Gal β 1,4GlcNAc als auch an SA α 2,3Gal β 1,3GalNAc binden und dass das hochpathogene Viet/04(H5N1) Virus stark an verschiedene SA α 2,3Gal-Reste bindet, welche durch MAA1 erkannt werden (Nicholls et al. 2007). Daher ist in dieser Studie die MAA1-MAA2 Kombination verwendet worden. Zudem konnte gezeigt werden, dass beide Zuckerreste Unterschiede in ihrem Expressionsmuster aufweisen. Während MAA1 vor allem am Bronchialepithel und Alveolarmakrophagen bindet, bleibt die Bindung von MAA2 hauptsächlich auf das Alveolarepithel beschränkt (Nicholls et al. 2007), was den Befund von Shinya et al. erklärten mag. Zusammengefasst konnten der aviäre (SA α 2,3Gal) als auch der humane Influenzavirusrezeptor (SA α 2,3Gal) im hier verwendeten Modell auf Typ I und Typ II Zellen, Alveolarmakrophagen und auf Bronchialepithelzellen nachgewiesen werden.

4.4 Zelltropismus saisonaler, pandemischer, aviärer und porciner Influenzaviren

Im Gegensatz zu saisonalen Influenzaviren, welche vor allem im oberen Respirationstrakt replizieren und nur in komplizierten Fällen eine virale Pneumonie verursachen, infizieren hochpathogene H5N1 Viren vor allem die Epithelien der unteren Atemwege, was in der Regel zur Entwicklung einer primären viralen Pneumonie mit häufig lethalem Ausgang führt (To et al. 2001; Soepandi et al. 2010). Die Mechanismen, welche zu der unterschiedlichen

Pathogenität beitragen, sind bisher nur ansatzweise verstanden. Als mögliche Ursachen werden die bei H5N1-Infektionen beobachtete exzessive Zytokinantwort (Chan et al. 2005; de Jong et al. 2006) sowie mögliche Unterschiede hinsichtlich des Zelltropismus diskutiert. So konnte mittels eines mathematischen Modells gezeigt werden, dass ein unterschiedlicher Zelltropismus zu unterschiedlichen Verläufen der Virustiterprofile zweier Influenzaviren führt (Dobrovolsky et al. 2010).

Bisher liegen nur wenige Studien vor, welche die Infektion der Viren direkt im humanen Lungengewebe immunhistologisch untersuchten (Tabelle 29). Ein Grund dafür ist der begrenzte Zugang zu normalem frischen humanen Lungengewebe für vergleichende *ex vivo* Infektionen. Zudem bezieht sich ein Großteil der Daten auf das Bindungsmuster inaktivierter markierter Viren (PVA – Pattern of Viral Attachment) auf rehydrierten Gewebeschnitten (Shinya et al. 2006; van Riel et al. 2006; van Riel et al. 2007; Chutinimitkul et al. 2010). So zeigten einige dieser Bindungsstudien, dass saisonale Viren an Typ I Zellen binden während hochpathogene aviäre Influenzaviren an Typ II Zellen binden (van Riel et al. 2006; van Riel et al. 2007). Dies ließ weiterhin vermuten, dass die unterschiedliche Pathogenität der Viren im Menschen unter anderem auf Unterschiede im Zelltropismus zurückzuführen ist. Da Typ I gegenüber den Typ II Zellen nur 40% der Alveolarepithelzellen ausmachen (Castranova et al. 1988) und eine geringere metabolische Aktivität aufweisen (Alan Stevens 1993), wurde vermutet, dass die Infektion mit saisonalen Viren mit einem geringeren Virustiter in der Lunge, welcher durch das Immunsystem besser kontrolliert werden kann, einhergeht. Wohingegen angenommen wurde, dass die Infektion der Typ II Zellen durch die hochpathogenen H5N1 Viren zu einem deutlich schwereren Infektionsverlauf führt, da sie 60% der Alveolarepithelzellen ausmachen (Castranova et al. 1988) und damit zahlreicher im Alveolarepithel vorkommen als Typ I Zellen und da sie metabolisch aktiver sind (Castranova et al. 1988), was zu einer höheren Replikationsfähigkeit der H5N1 Viren in der Lunge führt. Außerdem übernehmen die Typ II Zellen wichtige Funktionen in der Alveole. Dazu zählen die Surfactantproduktion und –freisetzung (Castranova et al. 1988; Andreeva et al. 2007), der Ionen- und Wassertransport (Castranova et al. 1988) sowie die Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung in Typ I Zellen, um diese bei einem alveolären Schaden zu ersetzen (Fehrenbach 2001). Bei Schädigung dieser Zelle ist somit u.a. ein wichtiger alveolärer Reparaturmechanismus außer Kraft gesetzt. Diese Hypothesen unterstützen eine Studie zur Influenzavirusinfektion im Makakenmodell, welche zeigte, dass die Infektion mit einem hochpathogenen H5N1 Virus zu einer deutlich höheren Viruslast in den Lungen der

entsprechenden Tiere führt als die Infektion mit einem saisonalen H1N1 Virus (Baskin et al. 2009). Immunhistologische Färbung des Lungengewebes zeigte zudem, dass in H5N1 Virus infizierten Lungen vorrangig Typ II Zellen und in H1N1 Virus infizierten Lungen vorrangig Typ I Zellen infiziert waren (Baskin et al. 2009).

Eine weitere Studie nutzte für den immunhistologischen Nachweis der Viren *post mortem* Lungengewebe zweier fataler H5N1 Fälle, an denen gezeigt wurde, dass ein hochpathogenes H5N1 Virus Zellen im Bronchial- und Alveolarepithel infiziert (Gu et al. 2007). Nur zwei der bisherigen Studien verwendeten primäres humanes *ex vivo* infiziertes Lungengewebe (Shinya et al. 2006; Nicholls et al. 2007). Nicholls et al. konnten dabei zeigen, dass H5N1 Viren Zellen im Alveolarepithel infizieren ohne dabei zwischen Typ I und Typ II Zellen zu unterscheiden. Shinya et al. verglichen verschiedene humanpathogene, HPAI und LPAI Viren hinsichtlich ihres Zelltropismus und zeigten, dass LPAI Viren nur Zellen im Alveolar- nicht aber im Bronchialepithel infizieren. Humanpathogene und HPAI Viren infizierten hingegen in dieser Studie Zellen im Bronchial- und im Alveolarepithel, wobei die Infektion des Bronchialepithels bei HPAI Viren jedoch Stamm-abhängig war. Alle in Tabelle 29 aufgeführten Studien stimmen darin überein, dass die jeweils getesteten Virussubtypen an Zellen im Alveolarepithel binden bzw. Zellen im Alveolarepithel infizieren können. Jedoch erfolgte keine weitere Differenzierung der infizierten Zellen. Allein die Studie von Van Riel et al. zeigte, dass markierte inaktivierte Viren des hochpathogenen Subtyps H5N1 an Typ II Zellen binden. Humanpathogene Viren banden ebenfalls an Zellen des Alveolarepithels, welche aus morphologischen Gründen als Typ I Zellen eingeordnet wurden. Unter der Voraussetzung dass die Bindung zur Infektion der Zelle führt, wurde spekuliert, dass dieser Unterschied im Zelltropismus die unterschiedliche Pathogenität von humanpathogenen und HPAI Viren begründet (van Riel et al. 2007).

Tabelle 29: Zusammenfassung publizierter Studien zum Zelltropismus von Influenza A Viren in der humanen Lunge

Subtyp	Pathogenität	Zelltropismus					Methode	Referenz
		BE	AE	Typ I	Typ II	AM		
H1N1, H3N2	human	++	+/-				PVA	Shinya et al. 2006
H3N2, H4N6	LPAI	+	++				PVA	
H5N1	HPAI	++	++				PVA	
H1N1, H3N2	human	++	++				ex vivo Infektion	
H3N2, H4N6	LPAI	-	++				ex vivo Infektion	
H5N1	HPAI	+/-	++				ex vivo Infektion	
H5N1	HPAI		+		++	++	PVA	van Riel et al. 2006
H1N1, H3N2	human	++	+			+/-	PVA	van Riel et al. 2007
H5N9, H6N1	LPAI	+	+			++	PVA	
H5N1	HPAI	+	+		++	++	PVA	
H3N2	human	++	++				PVA	
H5N1	HPAI	+/-	+				PVA	Chutinimitkul et al. 2010
H5N1	HPAI		++			++	ex vivo Infektion	Nicholls et al. 2007
H5N1	HPAI	++	++		++		post mortem Gewebe	Gu et al. 2007

PVA: Pattern of Viral Attachment

Rot: Verifizierung des Zelltyps durch Immunfärbung gegen spezifische Zellmarker

Auch im Mausmodell wurden Studien zum viralen Zelltropismus durchgeführt (Tabelle 30). Abgesehen von einer Studie, welche auf PVA-Assays beruhte, wurden hier keine Virussubtyp-vergleichenden Studien durchgeführt. Zwei Studien zeigen im Gegensatz zu den Daten aus humanem Gewebe, dass humanpathogene Viren Typ II Zellen infizieren (Ibricevic et al. 2006; Narasaraju et al. 2009), was für HPAI Viren bisher nicht im Mausmodell gezeigt wurde.

Tabelle 30: Zusammenfassung publizierter Studien zum Zelltropismus von Influenza A Viren in der murinen Lunge

Subtyp	Pathogenität	Zelltropismus					Methode	Referenz
		BE	AE	Typ I	Typ II	AM		
H5N1	HPAI	++	++	/	/	/	in vivo Infektion	Nishimura et al. 2000
H5N1	HPAI	/	+	/	/	/	PVA	van Riel et al. 2006
H1N1, H3N2	human	/	+/-	/	/	/	PVA	van Riel et al. 2007
H5N9, H6N1	LPAI	+	+	/	/	/	PVA	
H5N1	HPAI	+	+	/	/	/	PVA	
H1N1	human	++	+	/	++	/	in vivo Infektion	Ibricevic et al. 2007
H3N2	Human(Maus-adaptiert)	++	+	+/-	++	/	in vivo Infektion	Narasaraju et al. 2007

PVA: Pattern of Viral Attachment

Rot: Verifizierung des Zelltyps durch Immunfärbung gegen spezifische Zellmarker

Mittels Immunfärbung an *ex vivo* infizierten vitalen Gewebeproben sollte in dieser Studie der Zelltropismus von replikationsfähigen saisonalen, pandemischen, porcinen als auch aviären Influenzaviren systematisch verglichen werden. Es zeigte sich, dass alle getesteten Influenzaviren, trotz unterschiedlicher Replikationseffizienz, den gleichen Zelltropismus im unteren Respirationstrakt des Menschen aufweisen. Die hier durchgeführten immunhistologischen Färbungen erlaubten eine eindeutige Differenzierung von Typ I und Typ II Zellen und zeigten, dass im Alveolarepithel ausschließlich Typ II Zellen infiziert werden. Weiterhin infizierten alle Viren Bronchialepithelzellen. Außerdem fand sich ein Nachweis von viralem Antigen auch in wenigen Alveolarmakrophagen. Im Gegensatz zu Yu et al., welche die effiziente Replikation eines saisonalen H1N1 und eines hochpathogenen H5N1 Virus auf isolierten primären kultivierten Typ I-ähnlichen Alveolarepithelzellen zeigten (Yu et al. 2011), konnten in dieser Studie für keines der untersuchten Viren infizierte Typ I Zellen detektiert werden. Dieser Unterschied könnte dadurch erklärbar sein, dass in der Studie von Yu et al. Typ I-ähnliche Zellen verwendet wurden, welche durch *ex vivo* Kultivierung isolierter Typ II Zellen über mehrere Tage zu Typ I-ähnlichen Zellen dedifferenzierten. Dadurch können sich viele Eigenschaften der Typ I-ähnlichen Zellen von Typ I Zellen im Gewebeverband unterscheiden. Möglicherweise verbleiben einige Typ II Zellcharakteristika in den Typ I-ähnlichen Zellen nach der Differenzierung in der Zellkultur, was eventuell eine virale Replikation erlaubt.

Über die möglichen Gründe, warum trotz der Expression beider Rezeptoren sowohl auf Typ I als auch auf Typ II Zellen lediglich Typ II Zellen im Alveolarepithel infiziert wurden, lässt sich bisher nur spekulieren. Da bereits gezeigt wurde, dass die Influenzavirusinfektion durch den Verlust der spezifischen Sialinsäuren auf der Zellmembran verhindert werden kann (Belser et al. 2007; Chan et al. 2009), lässt sich vermuten, dass SA α 2,3Gal- und SA α 2,6Gal-Reste für eine erfolgreiche Infektion zwar notwendig aber nicht ausreichend sind. So könnten die Sialinsäuren eine wichtige Funktion für die initiale Annäherung des Viruspartikels an die Zellmembran haben, welche es dem Virion ermöglicht an einen potentiellen spezifischen transmembranen Rezeptor zu binden, welcher für eine erfolgreiche Internalisierung des Virus in die Zelle zusätzlich benötigt wird. So zeigte Eierhoff et al. eine vom EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) und anderen Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) abhängige Aufnahme der Influenza A Viren in A549 Zellen (Eierhoff et al. 2010). Die multivalente Bindung des HA an Sialinsäuren auf der Zelloberfläche scheint dabei zu der Formierung von Lipid Rafts zu führen,

wodurch die RTK Monomere in unmittelbare Nähe zueinander gebracht und dadurch aktiviert werden, wodurch es vermutlich zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden kommt, welche die Virusinternalisierung ermöglichen (Eierhoff et al. 2010). Mit Hilfe der Immunoelektronenmikroskopie konnte der EGFR in einer Studie zur Untersuchung der EGFR Verteilung in der humanen Lunge unter anderem in Typ II Zellen nicht jedoch in Typ I Zellen nachgewiesen werden (Aida et al. 1994), wodurch sich die ausschließliche Infektion von Typ II Zellen innerhalb des Alveolarepithels erklären könnte. Andererseits lässt sich spekulieren, dass das Virus sowohl in Typ II als auch in Typ I Zellen aufgenommen werden könnte, wobei die intrazellulären Bedingungen, in Typ I Zellen die virale Replikation des Virus nicht unterstützen oder verhindern. So identifizierten Karlas et al. 2010 in einem Genom-weiten RNA Interferenz Screening auf A549-Zellen 287 humane Wirtszellgene, welche die Influenza A Virusreplikation beeinflussen (Karlas et al. 2010). Es lässt sich daher spekulieren, dass das potentielle Fehlen bestimmter Wirtszellfaktoren in Typ I Zellen die virale Replikation verhindert.

Neben Typ II Zellen als hauptsächliche Zielzellen der getesteten Influenza Viren konnte Influenza A virales Antigen auch in Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden. Sie machten jedoch nur 4 bis 11% der Antigen-positiven Zellen im alveolären Raum aus. Die immunhistologischen Färbungen lassen jedoch keine Rückschlüsse darauf zu, ob es sich dabei um tatsächlich infizierte Zellen handelt oder um Zellen, welche das virale Antigen mittels Phagozytose absterbender infizierter Epithelzellen aufnahmen. Wenn man davon ausgeht, dass es sich um phagozytierte Influenza-A-Antigen-positive Zellreste handelt, hätten diese auch in Alveolarmakrophagen in MERS-CoV-infiziertem Gewebe vorkommen müssen. MERS-CoV-Antigen konnte hier jedoch nur extrem selten intrazellulär in Alveolarmakrophagen detektiert werden. Eine frühere Studie zu dem Replikationsverhalten von saisonalen Influenza A Viren in primären humanen Alveolarmakrophagen, welche mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnen wurden, zeigte, dass diese Zellen zumindest einen abortiven Infektionszyklus zulassen (Rodgers and Mims 1982). Nach *in vitro* Infektion mit einer MOI von 1 bis 5 waren in dieser Studie nach 24 h nur bis zu 20% der Zellen infiziert, wobei kein zytopathischer Effekt beobachtet wurde. Zudem stieg die Zahl infizierter Zellen über 96 h virusabhängig nicht oder nur gering an. Auch die Titration der Kulturüberstände zeigte keinen Anstieg infektiöser Partikel über die Zeit. Dieses Ergebnis konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden (van Riel et al. 2011). Replikationskurven zeigten hier, dass ein hochpathogenes H5N1 Virus als auch das 2009 pandemische H1N1 Virus nicht in primären

humanen Alveolarmakrophagen replizieren, während ein saisonales Virus mit geringer Effizienz repliziert, wobei 8 h nach der Infektion virales Antigen in 1 – 10% der Zellen nachweisbar war (van Riel et al. 2011). Die Replikationsfähigkeit der Viren auf einer Alveolarmakrophagenmonokultur lässt jedoch nur schwer Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation zu, wo die Zellen mit Typ I und Typ II Zellen zusammen vorliegen. So könnten z.B. bestimmte Trypsin-ähnliche Wirtsproteasen, welche die monobasische Spaltstelle des HA proteolytisch spalten und die Viren somit aktivieren nicht in Alveolarmakrophagen exprimiert werden, jedoch möglicherweise durch Typ I oder II Zellen freigesetzt werden, was eine produktive Virusreplikation in Alveolarmakrophagen begünstigen könnte. Man geht davon aus, dass das Hämagglutinin dieser Viren in der humanen Lunge extrazellulär durch verschiedene Trypsin-ähnliche Wirtsproteasen gespalten wird (Klenk and Garten 1994; Kido et al. 2008), wobei Studien darauf hindeuten, dass dabei die im menschlichen Respirationstrakt exprimierten Typ II transmembranen Trypsin-ähnlichen Proteasen TMPRSS2 (Transmembrane Protease, Serin 2), TMPRSS4 (Transmembrane Protease, Serin 4), HAT (Human Airway Trypsin-like Protease) und Matriptase (ST14 – Suppressor of Tumorigenictiy 14 Protein) eine Rolle spielen (Bottcher et al. 2006; Chaipan et al. 2009; Beaulieu et al. 2013). So konnte in einer Studie aus dem Jahr 2009 TMPRSS2-RNA mittels Microarray in primären, aus humanem Lungengewebe isolierten, Typ II-ähnlichen Zellen aber nicht in isolierten Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden (Wang et al. 2009). Dieser Zelltyp scheint auf Grund der geringen Zahl an infizierten Zellen und der niedrigen Virusproduktion für die Replikation der Influenzaviren eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Als bedeutende Zelle der angeborenen Immunität im alveolären Raum übernimmt der Alveolarmakrophage durch Phagozytose von Viruspartikeln und infizierten apoptotischen Zellen, sowie der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen jedoch eine protektive Funktion gegenüber der Influenzavirusinfektion in der Lunge. Die Mortalität in Mäusen und Schweinen nach Influenzavirusinfektion bei vorheriger Depletion von Alveolarmakrophagen steigt signifikant an (Tumpey et al. 2005; Kim et al. 2008). Wobei im Mausmodell nach Depletion der Alveolarmakrophagen zusätzlich signifikant höhere Virustiter und niedrigere Zytokin- und Chemokinspiegel gemessen werden konnten (Tumpey et al. 2005).

Da saisonale, pandemische, porcine, hoch- und niedrigpathogene aviäre Influenzaviren den gleichen Zelltropismus im unteren menschlichen Respirationstrakt aufwiesen, müssen die unterschiedliche Replikationseffizienz der Viren sowie die schweren Infektionsverläufe der hochpathogenen H5N1 Viren daher durch andere Faktoren verursacht werden. Dies stimmt

mit Daten aus der Studie von van Riel et al. überein, welche zeigten, dass niedrigpathogene aviäre Influenzaviren, welche in der humanen Lunge kaum replizieren, das gleiche Bindungsmuster wie die hochpathogenen H5N1 Viren aufweisen (van Riel et al. 2007).

4.5 Zelltropismus des neuen H7N9 Influenzavirus

Das im Menschen häufig mit schwerer Pneumonie und ARDS assoziierte neue H7N9 Virus infizierte in dieser Studie im Alveolarepithel ausschließlich Typ II Zellen. Die signifikant stärkere Replikationseffizienz des neuen H7N9 Virus gegenüber niedrigpathogenen aviären Isolaten des Subtyps H7 (Anhang 1) ist hier also ebenfalls nicht durch einen unterschiedlichen zellulären Tropismus zu erklären. Die höhere Replikationseffizienz sowie die hohe Pathogenität des neuen H7N9 Virus im menschlichen Wirt gegenüber niedrigpathogenen aviären Viren des Subtyps H7 könnte durch die Kombination verschiedener Faktoren begründet sein. Zum einen wurden im PB2 des neuen H7N9 Virus die Mutationen E627K (Gao et al. 2013) und D701N (Chen et al. 2013) detektiert. Die Reste K627 und N701 des PB2 sind mit einer erhöhten Pathogenität in der Maus sowie einer erhöhten Replikationseffizienz aviärer Influenzaviren im Säuger assoziiert (Hatta et al. 2001; Li et al. 2005; Labadie et al. 2007). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass das neue H7N9 Virus in der humanen Lunge eine weniger starke Typ I Interferonantwort induziert als niedrigpathogene aviäre Isolate des Subtyps H7 und dass das NS1 Protein des neuen H7N9 Virus ein potenter Inhibitor der RIG-I-abhängigen antiviralen Interferon-Antwort ist und die Aktivierung des IFN- β Promotors in 293T-Zellen signifikant stärker unterdrückt als niedrigpathogenen aviären Viren des Subtyps H7 (Knepper et al. 2013).

Die bei dem neuen H7N9 Virus detektierte Q226L Mutation (H3 HA Nummerierung) im Hämagglutinin (Watanabe et al. 2013; Zhou et al. 2013), von der vermutet wird, dass sie über die Bindung an aviäre Rezeptoren (SA α 2,3Gal) hinaus zusätzlich die Bindung an humane Rezeptoren (SA α 2,6Gal) ermöglicht (Rogers et al. 1983; Shi et al. 2013), scheint zumindest im unteren Respirationstrakt keine Rolle zu spielen, da sowohl das neue H7N9 Virus sowie die mitgeführten niedrigpathogenen aviären Viren des Subtyps H7 hier den gleichen Zelltropismus zeigten.

Die effiziente Replikationsfähigkeit sowie die gegenüber aviären Isolaten des Subtyps H7 signifikant geringere Induktion der Typ I Interferonantwort in der humanen Lunge lässt darauf schließen, dass das neue H7N9 Virus gegenüber anderen niedrigpathogen aviären

Influenzaviren natürlicherweise gut an eine Vermehrung im menschlichen Lungengewebe angepasst ist. Dies mag die in H7N9 Virus-infizierten Menschen beobachteten schweren Verläufe unterer Atemwegserkrankungen mit häufig schnell fortschreitender Pneumonie und ARDS erklären.

4.6 Pulmonale Fibrose als Risikofaktor für schwere Verläufe der Influenzavirusinfektion

Mittels Genom-weitem RNA Interferenz Screening auf A549-Zellen konnten eine Vielzahl zellulärer Faktoren identifiziert werden, welche für die Replikation von Influenzaviren beeinflussen (Karlas et al. 2010; König et al. 2010). Dies verdeutlicht, dass der Verlauf einer Influenzavirusinfektion nicht nur von der Pathogenität des Virus, sondern auch von Wirtszellfaktoren beeinflusst wird. In der Tat ist das Risiko schwerer Infektionsverläufe des 2009 pandemischen H1N1 Virus durch bestimmte chronische Vorerkrankungen, wie z.B. Adipositas, Diabetes, Asthma, bronchiale oder pulmonale Fibrose erhöht (Campbell et al. 2010; Nguyen-Van-Tam et al. 2010). Fujino et al. zeigten, dass das 2009 pandemische H1N1 Virus auf primären Typ II Zellen, welche aus fibrotischen Lungen isoliert wurden zu signifikant höheren Titern wächst als auf Typ II Zellen, welche aus nicht-fibrotischen Lungen isoliert wurden (Fujino et al. 2013). Die für die pulmonale Fibrose typische starke Typ II Proliferation führt wahrscheinlich zu einem veränderten intrazellulären Milieu, welches die virale Replikation begünstigt. Die dafür verantwortlichen Wirtszellfaktoren sind bisher nicht bekannt. Die Beobachtung der stärkeren Replikationsfähigkeit des Virus in Typ II Zellen fibrotischer Lungen stellt eine erste mögliche Ursache für die schweren Verläufe der Influenzavirusinfektion bei Patienten mit pulmonaler Fibrose dar.

Die von Fujino et al. durchgeführte Studie bezieht sich allerdings auf Typ II Zellmonokulturen und berücksichtigt dabei nicht die bei der pulmonalen Fibrose beobachteten typischen Veränderungen im Gewebe, wie z.B. die Akkumulation der extrazellulären Matrix und Veränderungen der Zahlen der unterschiedlichen Zelltypen (Fernandez and Eickelberg 2012). Die hier durchgeführten Immunfärbungen nicht infizierter Gewebeschnitte fibrotischer Lungen ließen eine für die pulmonale Fibrose typische Typ II Zellhyperplasie erkennen. Immunfärbungen Pan/99(H3N2)-infizierter fibrotischer Lungen zeigten dass ein saisonales H3N2 Virus einen starken Tropismus für proliferierende Typ II Zellen in fibrotischen Lungen aufweist. Da Typ II Zellen den primären Replikationsort für Influenzaviren in der Lunge darstellen, führt die erhöhte Zahl an Typ II Zellen in fibrotischen Lungen folglich ebenfalls zu

einer erhöhten Zahl infizierter Zellen im Gewebe. Dies kann, neben Veränderungen intrazellulärer Faktoren in diesem Zelltyp, ebenfalls zu einer verstärkten Replikation des Virus in der Lunge beitragen.

Welche Faktoren zusätzlich zu den schweren Verläufen der Influenzavirusinfektion bei pulmonaler Fibrose beitragen bleibt zu untersuchen. Erste Hinweise aus der Literatur verweisen auf die Expression von ELMOD2 (ELMO Domain Containing 2). Es konnte gezeigt werden, dass die ELMOD2-mRNA Expression in fibrotischen Lungengewebeproben gegenüber der Expression in Kontrollgewebe signifikant erniedrigt ist (Hodgson et al. 2006). Die Beobachtung, dass ELMOD2 die IFN-vermittelte antivirale Immunantwort reguliert und nach Influenzavirusinfektion in seiner Expression reduziert wird (Pulkkinen et al. 2010), lässt vermuten, dass die Influenzavirusinfektion in Patienten mit pulmonaler Fibrose zu schweren Verläufen führt, da diese Patienten auf Grund der niedrigen ELMOD2-Expression ohnehin eine abgeschwächte antivirale Immunantwort aufweisen.

4.7 Alveolärer Schaden nach Influenzavirusinfektion

Mit Hilfe eines PR8 NS1-GFP(H1N1) Virus (Kuznetsova et al. 2014) und der Technik der spektralen Lebendgewebemikroskopie war es erstmalig möglich das Schicksal einer Influenzavirus-infizierten Zelle direkt im humanem Gewebeverband zu verfolgen. Infizierte Zellen des Alveolarepithels zeigten 16 h nach der Infektion morphologische Zeichen der Apoptose. Im weiteren Verlauf lösten sie sich aus dem epithelialen Zellverband heraus. Aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten ist bekannt, dass die Influenzavirusinfektion Apoptose in einer Vielzahl von Zelltypen induziert (Takizawa et al. 1993; Hinshaw et al. 1994; Mori et al. 1995; Colamussi et al. 1999; Nichols et al. 2001). Der Untergang der Typ II Zelle hat sowohl negative als auch positive Auswirkungen auf die Alveole. Er führt nicht nur zum Verlußt der alveoären Barrierefunktion sondern auch zu einer verminderten Surfactantproduktion und –freisetzung, was einen alveolären Kollaps nach sich zieht. Mit dem Untergang der Typ II Zellen geht auch ein wichtiger alveolärer Reparaturmechanismus verloren. Andererseits verhindert der kontrollierte Zelltod der infizierten Zelle die Freisetzung neuer Viruspartikel, was der Ausbreitung des Virus im Gewebe entgegenwirkt. Respiratorische Epithelzellen sind Bestandteil der angeborenen Immunität und setzen nach Influenzavirusinfektion eine Reihe proinflammatorischer Zytokine frei (Chan et al. 2005; Yu et al. 2011). Die Apoptose dieser Zellen hat somit außerdem eine reduzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zur

Folge (Brydon et al. 2003). Dies vermindert einerseits die indirekte Schädigung des alveolären Kompartimentes durch eine überschießende Inflammation. Andererseits kann die somit verminderte Immunreaktion wiederum eine weitere Ausbreitung des Virus im Gewebe begünstigen. Der diffuse Alveolarschaden (DAD), welcher bei Influenzavirus-infizierten Patienten mit ARDS als typischer histopathologischer Befund detektiert wird (Taubenberger and Morens 2008), ist vermutlich direkt auf die infektionsbedingte Apoptose infizierter Typ II Zellen aber auch indirekt auf eine Zytokindysregulation zurückzuführen (Gao et al. 2013). Bisherige Studien zeigten, dass die Influenzavirus-induzierte Apoptose sowohl extrinsisch über Fas/FasL (Fujimoto et al. 1998), TNF α /TNF α R und TRAIL/DR4, DR5 (Herold et al. 2008) sowie über intrinsische Mechanismen, bei der die Aktivierung der PKR zur Aktivierung pro-apoptotischer Gene führt (Balachandran et al. 1998; Gil and Esteban 2000), vermittelt werden kann. Auch ein über einen autokrinen Effekt von TGF- β vermittelten Mechanismus wird diskutiert (Schultz-Cherry and Hinshaw 1996). Der genaue Mechanismus ist jedoch unklar. Immunfärbungen einer Studie, welche die Viruslast und die Apoptoseinduktion im Lungengewebe von 50 Lungenproben fatal verlaufender Fälle der pandemischen H1N1 Influenza von 2009 untersuchte, zeigten apoptotische Zellen im Bronchial- und Alveolarepithel (Gao et al. 2013). Die FasL mRNA-Expression korrelierte positiv mit der Viruslast und war gegenüber der Expression in Kontrollgewebe deutlich erhöht, wohingegen die Expression des Fas-Gens gegenüber Kontrollgewebe deutlich erniedrigt war. Es wurde vermutet, dass die erhöhten FasL-Spiegel für die Apoptoseinduktion im Lungengewebe und die damit verbundenen histopathologischen Veränderungen, welche im Lungengewebe fatal verlaufender A(H1N1)pdm09-Infektion detektiert wurden, verantwortlich sind. Des Weiteren wurde spekuliert, dass das beobachtete Missverhältnis zwischen Fas und FasL dabei vermutlich zu einer verzögerten Clearance des Virus beiträgt (Gao et al. 2013).

Im Mausmodell wurde zudem gezeigt, dass in Influenza A infizierten Tieren der TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) auf alveolär rekrutierten Makrophagen im Vergleich zu peripheren Blutmonozyten signifikant hochreguliert ist und dass diese eingewanderte Exudatmakrophagen signifikant zur Alveolarepithelzellapoptose und zum Verlust der alveolären Barrierefunktion beitragen (Herold et al. 2008).

Da es in dem hier verwendeten Lungengewebe Modell zu keiner Rekrutierung weiterer Immunzellen aus Blutstrom kommt, lässt sich vermuten, dass die hier gezeigte Apoptose Influenzavirus-infizierter Typ II Zellen im lebenden Gewebeverband intrinsisch ausgelöst

wurde. Der Untergang der multifunktionellen Typ II Zellen im Gewebeverband zeigt den direkt durch das Virus ausgelösten alveolaren Schaden.

4.8 Restriktion niedrig pathogener aviärer Viren in der humanen Lunge durch Produktion von hauptsächlich nicht-infektiösen Nachkommenviren

Alle hier getesteten Influenzaviren infizierten primär Typ II Zellen. Dies lässt den Schluss zu, dass die unterschiedliche Replikationsfähigkeit der Viren in der humanen Lunge nicht durch einen unterschiedlichen Zelltropismus, sondern eher durch ein ungleiches Vermögen der Viren in den Typ II Zellen effizient zu replizieren begründet ist. Der immunhistologische Befund, dass durch das niedrigpathogene aviäre H12N5 Virus, trotz deutlich geringerer Replikationseffizienz, signifikant mehr Zellen als durch das saisonale H3N2 Virus im Lungengewebe infiziert waren, lässt darauf schließen, dass das aviäre Virus hier nicht durch eine verminderte Fähigkeit zur Infektion der Zellen sondern eher durch spätere Schritte im viralen Infektionszyklus restringiert ist. So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Infektion von humanem Lungengewebe mit dem aviären und mit dem saisonalen Virus zur Freisetzung der gleichen Anzahl an hämagglutinierenden Partikeln führt. Der Vergleich der Anzahl der während der Infektion freigesetzten infektiösen und physikalischen Partikel ergab jedoch, dass bei dem aviären Virus nur einer von ca. 59000 Partikeln infektiös war. Bei dem saisonalen Virus war dagegen ein Partikel von insgesamt 117 physikalischen Partikeln infektiös, was mit einem bei Influenzaviren durchschnittlichen Partikel/pfu Verhältnis von 1/10 bis 1/100 übereinstimmt (Donald and Isaacs 1954; Kingsbury 1970; Nakajima and Sugiura 1977; Hutchinson et al. 2008). Die unterschiedlich verlaufenden Wachstumskurven humaner und niedrigpathogener aviärer Viren sind demnach auf eine deutlich höhere Diskrepanz zwischen den freigesetzten infektiösen und nicht-infektiösen Virionen bei niedrigpathogenen aviären Viren zurückzuführen (Abbildung 38). Die Freisetzung von vor allem nicht-infektiösen Viruspartikeln im Fall des aviären Virus könnte durch Verpackungsfehler des segmentierten Genoms bei der Zusammensetzung der Viren verursacht worden sein. Die viralen Segmente M, PB1 und PB2 wurden daher exemplarisch im Überstand der Gewebekultur absolut quantifiziert. Alle 3 Segmente des aviären Virus sind jedoch nicht nur in einem gleichen molaren Verhältnis zueinander sondern auch gegenüber den Segmenten des saisonalen Virus vorhanden. Diese aus *ex vivo* Infektionen von primärem humanem Lungengewebe gewonnenen Ergebnisse wurden in A549-Zellen, welche als Modellsystem für humane alveoläre Epithelzellen verwendet werden, bestätigt. Auch hier

zeigte sich, dass der Überstand der mit dem aviären Virus infizierten Zellen, zwar genauso viele physikalische Partikel enthielt wie nach Infektion mit dem saisonalen Virus, dass aber nur ein geringer Teil dieser Partikel infektiös war. Diese Diskrepanz war allerdings weniger stark ausgeprägt als die bei der Infektion von den Gewebeproben.

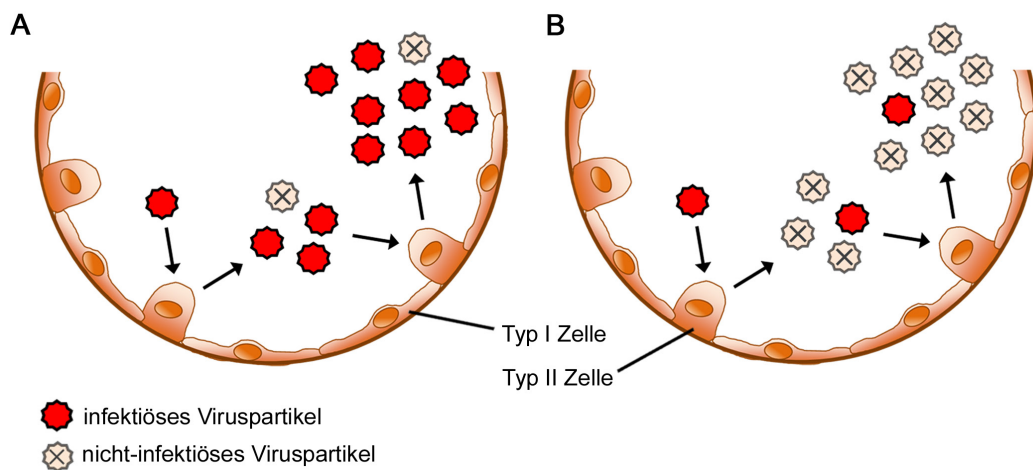


Abbildung 38: Modell der Replikation humanpathogener und niedrigpathogener aviärer Influenzaviren in der Alveole.

Humanpathogene (A) als auch niedrigpathogene aviäre Influenzaviren (B) replizieren ausschließlich in Typ II Zellen. Die Replikation in diesem Zelltyp führt bei humanpathogenen und niedrigpathogenen aviären Viren zur Freisetzung der gleichen Anzahl an Virionen, wobei bei humanpathogenen Viren der Anteil an infektiösen Virionen signifikant höher ist als bei niedrigpathogenen aviären Influenzaviren.

Das verminderte Replikationsvermögen des aviären H12N5 Virus gegenüber des saisonalen H3N2 Virus in der humanen Lunge ist also weder auf eine verminderte Fähigkeit der Viren zur Infektion dieser Zellen noch auf einen abortiven Replikationszyklus zurückzuführen, sondern auf die Freisetzung von vor allem nicht infektiösen Partikeln. Die Infektiösität wurde mittels Plaque Assay getestet, welcher nur einen vollständigen lytischen Replikationszyklus detektiert. Die nicht-infektiösen Partikel in der Nachkommengeneration könnten daher entweder überhaupt nicht in der Lage sein weitere Zellen zu infizieren oder zumindest eine abortive Infektion verursachen. Das Vorhandensein der viralen Segmente M, PB1 und PB2 in einem gleichen molaren Verhältnis zueinander sowie zu der Anzahl der HAPs schließt das Fehlen oder den verminderten Einbau von zumindest je einem dieser drei Segmente als Ursache für die nicht-Infektiösität der Partikel aus.

Lange Zeit war es umstritten, ob es sich bei der Verpackung des Genoms von Influenza A Viren um einen zufälligen Mechanismus handelt, bei dem in einer unspezifischen Weise mehr als 8 RNPs in das Virion eingebaut werden, so dass ein gewisser Anteil der Virione alle 8 Segmente enthält und somit intakt ist (Hirst 1962), oder ob ein segmentspezifischer Mechanismus selektiv zu der Verpackung von jeweils nur einer Kopie aller 8 Segmente führt (Kingsbury 1970). In den letzten Jahren verdichteten sich allerdings die Argumente, dass es sich bei dem Verpacken des viralen Genoms um einen selektiven Prozess handelt (Fujii et al. 2003; Noda et al. 2006; Chou et al. 2012). Die in dieser Studie im Überstand der Zell- und Gewebekulturen gemessenen absoluten Zahlen der Kopien des M-, PB1- und des PB2 Segmentes beider Viren stimmten mit der absoluten Zahl der hämagglutinierenden Partikel überein, was vermuten lässt, dass pro Viruspartikel jeweils nur eine Kopie der 8 Gensegmente enthalten ist, was die Theorie der selektiven spezifischen Genomverpackung unterstützt.

Das niedrigpathogene aviäre Virus zeigte in dieser Studie keine verminderte Infektionseffizienz in der humanen Lunge, ausserdem wurden ebenso viele Viruspartikel freigesetzt wie durch das saisonale Virus. Die Freisetzung von jedoch hauptsächlich nicht-infektiösen Partikeln und die daraus resultierende sehr geringe Replikationseffizienz in der humanen Lunge verdeutlicht die fehlende Adaption des Virus an den menschlichen Wirt. Wirtszellfaktoren, welche für eine korrekte Virussynthese aviärer Viren benötigt werden, scheinen sich in humanen und aviären Zellen derart zu unterscheiden, dass es zur Synthese defekter Viruspartikel kommt. Welche Virus- oder Wirtsbedingten Faktoren die nicht-Infektiösität der freigesetzten Partikel begründen, bleibt zu untersuchen.

So könnte man neben den in dieser Studie exemplarisch quantifizierten M-, PB1- und PB2 Segmenten ausserdem die verbleibenden 5 viralen Gensegmente des H3N2 und des H12N5 Virus in ihrer Quantität vergleichen, um zu schauen, ob eventuell ein anderes Gensegment nicht verpackt wurde.

Wie die Plaque-Assays zeigten, vermag die Mehrzahl der H12N5 Viruspartikel aus dem Lungen-oder A549 Zellüberstand keinen vollständigen lytischen Replikationszyklus in MDCK-Zellen zu vollziehen. Die Ursache dafür könnte z.B. in einem Fehler im Hämagglutinin liegen, wodurch es zu keiner Membranfusion und dementsprechend zu keiner erfolgreichen Infektion der Zelle mehr kommen kann. Um herauszufinden, ob die nicht-Infektiösität dieser Viruspartikel bereits durch eine nicht stattfindende Membranfusion oder durch Fehler in späteren Schritten des viralen Replikationszykluses verursacht wird, könnte man die Viruspartikel entsprechend einer 2005 von Sakai et al. entwickelten Methode mit zwei

Fluoreszenzfarbstoffen markieren und die Membranfusion mittels dualer Wellenlängenmikroskopie verfolgen (Sakai et al. 2006). Bei dieser Technik führt die Markierung der Lipiddoppelschicht der Viren mit den zwei lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen DiOC18 und R18 im Fluoreszenzspektrum zu der Entstehung eines schwachen Peaks im roten Wellenlängenbereich (586 nm), welcher durch R18 emittiert wird und eines schwachen Peaks im grünen Wellenlängenbereich (510 nm), welcher durch DiOC18 emittiert wird. Die Intensität des grünen Peaks wird zum einen durch selbst-Quenching und zum anderen durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) von DiOC18 zu R18 vermindert. Sobald das Virus mit der Endosomenmembran fusioniert, nimmt die Dichte der Farbstoffe ab, wodurch das selbst-Quenching sowie der FRET-Effekt aufgehoben werden und eine Verschiebung von roter zu grüner Fluoreszenz detektiert werden kann.

4.9 Infektionsverhalten von MERS-CoV in humanem Lungengewebe

Die MERS-CoV-Infektion im Menschen wird mit einer akuten, schnell fortschreitenden Pneumonie und akuten Lungenversagen assoziiert (Zaki et al. 2012; Chan et al. 2013), wobei Fallstudien MERS-CoV-infizierter Patienten eine hohe Viruslast im unteren Respirationstrakt beschreiben (Drosten et al. 2013; Guery et al. 2013). Da bis heute keine Autopsiestudien vorliegen, fehlen wegweisende Informationen zur Virus-Wirts-Interaktion in der menschlichen Lunge. Das hier vorgestellte *ex vivo* Infektionsmodell erlaubte daher erstmalig die Untersuchung virus- und wirtsabhängiger Faktoren, welche der MERS-CoV-Infektion zu Grunde liegen direkt in primärem humanen Lungengewebe.

Obwohl das MERS-CoV ähnlich zu hochpathogenen H5N1 Viren, welche im Menschen ebenfalls häufig zur akuten Pneumonie mit schwerem akuten Lungenschaden (ARDS) führen, sehr effizient in der humanen Lunge replizierte (Anhang 2), unterscheiden sich beide Viren deutlich hinsichtlich ihres Zelltropismus. Das MERS-CoV zeigte im Gegensatz zum Thai/04 (H5N1) Virus welches ohne Unterscheidung zu saisonalen, pandemischen, aviären und porcinen Influenza Viren im alveolären Kompartiment hauptsächlich Typ II Zellen und zu einem geringen Anteil Alveolarmakrophagen infizierte (Weinheimer et al. 2012), einen viel breiteren Zelltropismus im unteren Respirationstrakt. So wurde das gesamte alveoläre Kompartiment einschließlich Typ I und Typ II Zellen, Bronchialepithelzellen und Endothelzellen durch MERS-CoV infiziert. MERS-CoV-positive Alveolarmakrophagen konnten jedoch nur extrem selten detektiert werden. Die Infektion von Typ I (Anhang 3) und Typ II Zellen durch das MERS-CoV konnte zudem durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von infiziertem Lungengewebe bestätigt werden (Anhang 4). In beiden Zelltypen konnten sich intravesikulär abschnürende Viruspartikel detektiert werden.

In dieser Studie wurde ebenso erstmalig die pulmonale Expression des durch Raj et al. identifizierten funktionellen Rezeptors von MERS-CoV, der Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) (Raj et al. 2013), im Menschen dokumentiert. Es zeigte sich eine konstitutive Expression des Rezeptors in allen infizierten Zelltypen und darüber hinaus auch in Alveolarmakrophagen. Welche Rolle DPP4 bei der Aufnahme des Virus in die Zelle hat, ist bisher nicht geklärt. Der Befund, dass virales Antigen in diesem Zelltyp, trotz starker DPP4-Expression, kaum intrazellulär, jedoch häufig auf der Zelloberfläche nachweisbar war, lässt vermuten, dass DPP4 zwar notwendig jedoch nicht ausreichend für eine Infektion sein könnte.

Raj et al. zeigten 2013 eine DPP4-Expression in humanem Bronchialgewebe in nicht-zilientragenden Zellen jedoch nicht in zilientragenden Zellen. Nach Infektion von kultivierten humanen Bronchialepithelzellen konnte dsRNA zudem ebenfalls lediglich in nicht-zilientragenden Zellen jedoch nicht in zilientragenden Zellen nachgewiesen werden (Raj et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnte die DPP4-Expression in dieser Studie eindeutig sowohl auf zilientragenden als auch auf nicht-zilientragenden Zellen gezeigt werden. Immunhistologische Färbungen *ex vivo* infizierter Gewebestücke zeigten darüber hinaus ebenfalls die Infektion beider Bronchialepithelzelltypen.

Zudem wurden MERS-CoV-infizierte Epithelzellen detektiert, welche sich in Apoptose befanden, welches ferner zur Trennung alveolarer junktionaler Verbindungen und zur konsekutiven Ablösung der infizierten Zellen von der Basalmembran führte. Zusammen mit der Detektion infizierter Pneumozyten in der Broncho-Alveolären-Lavage eines MERS-CoV-infizierten Patienten weist dies auf einen erheblichen Apoptose-bedingten strukturellen alveolaren Epithelzellschaden hin. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass in MERS-CoV-infizierten Calu-3-Zellkulturen ein starker zytopatischer Effekt innerhalb von 24 h nach der Infektion auftrat, welcher mit einer massiven Ablösung der Zellen von Boden der Zellkultur einherging und durch massive Apoptose bedingt war (Tao et al. 2013). Dieser zytopatische Effekt war in SARS-CoV-infizierten Calu-3-Zellkulturen frühestens nach 5 Tagen zu beobachten. Die Apoptose scheint daher ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus der MERS-CoV-Infektion zu sein.

Der Untergang von Typ I und Typ II Zellen hat drastische Auswirkungen auf die Lungenfunktion. So kann z.B. die weitflächige Infektion von Typ I Zellen zu einem verminderten Gasaustausch und einem Verlust der Barrierefunktion führen, während die Infektion von Typ II Zellen eine Reduktion der Surfactantproduktion sowie einen alveolären Kollaps nach sich ziehen kann. Typ II Zellen können nach Schädigung des Alveolarepithels zu Typ I Zellen differenzieren und diese somit ersetzen. Durch die Infektion und den Untergang beider Zelltypen fällt dieser Reparaturmechanismus weg.

Virales Antigen war in dieser Studie zudem in Endothelzellen kleiner und großer pulmonaler Gefäße nachweisbar. Es lässt sich dabei jedoch nicht ausschließen, dass dies durch die Natur des Modells bedingt ist. Im Gegensatz zur *in vivo* Situation, bei der die Viren durch die epitheliale Barriere zunächst keinen Zugang zum Endothel haben, sind die Endothelzellen in der *ex vivo* Gewebekultur durch den Anschnitt der Gefäße teilweise frei zugänglich. Nichtsdestotrotz zeigt der Nachweis von viralem Antigen in diesem Zelltyp, dass

Endothelzellen prinzipiell durch MERS-CoV infiziert werden können, während dies, bei Verwendung des gleichen Modells, durch Influenza A Viren nicht der Fall war. Bei Vorhandensein des hier gezeigten alveolaren Epithelzellschadens könnte das Virus jedoch auch in der *in vivo* Situation Zugang zum Endothel erhalten. In dieser Studie durchgeführte elektronenmikroskopische Aufnahmen von MERS-CoV-infiziertem Gewebe (Micheal Laue, RKI) zeigten zudem Viruspartikel in der Basallamina, direkt unter intakten infizierten Typ I Zellen (Anhang 3 D), was eine mögliche basolaterale Freisetzung der Viren vermuten lässt. Dies wurde in einer Studie bestätigt, welche in polarisierten MERS-CoV-infizierten Calu-3 Zellen sowohl eine apikale als auch eine basolaterale Freisetzung der Viren beobachtete (Tao et al. 2013). Das Virus könnte daher auch in der *in vivo* Situation das Endothel infizieren und in den Blutstrom gelangen und sich so, ähnlich zum SARS-Coronavirus, systemisch verbreiten (Gu et al. 2005; Gu and Korteweg 2007). So gibt es in der Tat Fallberichte bei denen virale RNA des MERS-CoV, wenn auch mit einer niedrigeren Kopienzahl als im Respirationstrakt, im Blut (Guery et al. 2013), im Urin und im Stuhl (Drosten et al. 2013) gefunden wurde.

Systematische Studien zum zellulären Tropismus des SARS-CoV in der humanen Lunge liegen bisher nicht vor. Eine Studie konnte jedoch, mittels *in-situ*-Hybridisierung (ISH) an post-mortem Gewebe SARS-CoV infizierter Patienten, SARS-CoV-RNA in Pneumozyten im Alveolarepithel und in Zellen im alveolaren Septum nachweisen (Chen and Hsiao 2004). Wobei hier im Gegensatz zu MERS-CoV-infiziertem Gewebe keine massive Infektion des gesamten alveolaren Kompartiments gezeigt wurde. Obwohl hier keine Doppelfärbungen gegen spezifische Zellmarker durchgeführt wurden, deuten die Morphologie und Anordnung der detektierten SARS-CoV-RNA-positiven Pneumozyten hier eher auf eine Infektion von Typ II Zellen hin. Eine weitere Studie zeigte zudem, dass das SARS-CoV in kultivierten primären humanen alveolären Typ II Zellen jedoch nicht in Typ I-ähnlichen Zellen repliziert (Mossel et al. 2008). Das MERS-CoV unterscheidet sich somit von dem SARS-CoV gravierend hinsichtlich deutlich des Zelltropismus. Während das SARS-CoV lediglich Typ II Zellen im Alveolarepithel zu infizieren scheint, repliziert das MERS-CoV sowohl in Typ I und Typ II Zellen sowie in Epithelzellen, was zu einer massiven Infektion der gesamten Alveolarwand führt.

Die ubiquitäre Expression des MERS-CoV Rezeptors DPP4 macht diesen zu einem potentiellen Target für therapeutische Ansätze. DPP4 ist ein validiertes Targetmolekül für die Behandlung des Diabetes Mellitus Typ 2. Eine Reihe von DPP4-Inhibitoren werden bereits, ohne die Registrierung von Langzeitnebenwirkungen über die letzten Jahre, erfolgreich in der Diabetes

Mellitus Typ 2 Therapie eingesetzt (Mendieta et al. 2011). Diese könnten somit eventuell ebenfalls bei der Behandlung der MERS-CoV-Infektion Einsatz finden.

Die Inhibierung von DPP4 könnte außerdem gewebeschädigenden Aspekten der antiviralen Immunantwort entgegenwirken. So unterdrücken reversible Inhibitoren der DPP4-Enzymaktivität die T-Zellproliferation und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und IL-10 (Reinhold et al. 2008).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz wäre der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen die Rezeptorbindedomäne (RBD) des Spikeproteins des MERS-CoV, mit welcher es an DPP4 bindet. Es wurde bereits durch verschiedene Gruppen die Entwicklung potenter humaner neutralisierender Antikörper gegen MERS-CoV beschrieben, welche gegen die RBD des MERS-CoV-Spikeproteins gerichtet sind (Jiang et al. 2014; Tang et al. 2014; Ying et al. 2014). Der neutralisierende Effekt dieser monoklonalen Antikörper konnte bisher jedoch nur in *in vitro* gezeigt werden. Die Effizienz dieser Antikörper im Tiermodell bleibt zu untersuchen.

Der Verlust der alveolären Epithelzellbarriere ist ein grundlegender Mechanismus respiratorischer Erkrankungen mit schwerem akutem Lungenversagen (Matthay et al. 2012). Die hier gezeigte großflächige Infektion im alveolären Kompartiment mit der einhergehenden Schädigung ist konsistent mit dem häufig bei MERS-CoV Patienten beobachteten schweren akuten Lungenversagen. Unterschiede hinsichtlich des zellulären Tropismus, der Apoptoseinduktion und lateralen Freisetzung neuer Viruspartikel könnten die deutlich höhere Letalität des MERS-CoV gegenüber dem SARS-CoV erklären.

4.10 Humanes *ex vivo* kultiviertes Lungengewebe als Infektionsmodell

Die Wahl eines experimentellen Systems zur Modellierung von Infektionsverläufen im menschlichen Wirt ist oft schwierig und ein entscheidender Faktor für die Interpretation der erhaltenen Daten. Studien zur Untersuchung der Influenzavirus- und Coronavirusinfektion fanden bisher vor allem in Monokulturen immortalisierter pulmonaler Zelllinien statt, welche entweder viral transformiert oder kanzerös sind und sich demnach stark von Primärzellen unterscheiden. Zusätzlich wachsen die Zellen dabei meist als Monolayer-Kulturen auf Kunststoffoberflächen. Die unnatürliche Umgebung sowie das häufige Passagieren der Zellen kann zur Dedifferenzierung der Zellen und dementsprechend zum Verlust zelltypischer Eigenschaften führen. Die A549 Adenokarzinom-Zelllinie der Lunge wird häufig als Modellsystem für Typ II Pneumozyten verwendet. Studien haben jedoch gezeigt, dass diese Zellen wichtige morphologische (Mason and Williams 1980) und molekulare Marker (Korst et

al. 1995; Li et al. 1998; Corbiere et al. 2011) der Typ II Pneumozyten verloren haben. Es handelt sich dementsprechend um Zellen, welche zwar Eigenschaften von Typ II Zellen besitzen, jedoch keine Typ II Zellen sind. Die Wirtszellaktivierung durch Influenza A Viren in A549 Zellen können sich daher von Antwort in Typ II Pneumozyten unterscheiden.

Auch Tiermodelle eignen sich auf Grund der genetischen Unterschiede zum Menschen nur bedingt als Modellsystem. Das am häufigsten verwendete Tiermodell für die Influenzavirusinfektion ist die Maus (*Mus Musculus*). Studien im Mausmodell sind kostengünstig und praktisch leicht durchführbar. Zusammen mit der Möglichkeit der genetischen Manipulation und der daraus resultierenden große Bandbreite an transgenen und Knockout-Mäusen ist das Mausmodell für immunologische Untersuchungen von Vorteil. Die mit diesem Modell gewonnen Daten lassen sich jedoch nicht immer direkt auf den Menschen übertragen. Grund dafür sind erheblicher Unterschiede zwischen humaner und muriner Anatomie als auch zwischen humanem und murinem Immunsystem (Irvin and Bates 2003; Mestas and Hughes 2004). Während man beispielsweise bei der murinen Lunge nur 13-17 Bronchialgenerationen zählt, besitzt die humane Lunge von der Trachea bis zu den Alveolen bis zu 23 Generationen. Ein Unterschied der angeborenen Immunität ist die zum Teil unterschiedliche Expression und Funktion von Toll-like Rezeptoren (TLRs). Während im Menschen nur 10 TLRs bekannt sind, findet man in der Maus 13 TLRs (Bryant and Monie 2012), wobei z.B. ssRNA im Menschen durch TLR8, in der Maus jedoch durch TLR7, erkannt wird (Bryant and Monie 2012).

Da die Maus nicht zum natürlichen Wirtsspektrum von Influenzaviren gehört, finden die meisten Infektionsstudien mit Maus-adaptierten Laborstämmen, wie dem A/Puerto Rico/8/1938 (H1N1) (PR8) oder dem A/WSN/1933 (H1N1) (WSN), statt. Humanpathogene Influenzaviren replizieren zwar im murinen Respirationstrakt, eine vorhergehende Anpassung an den murinen Wirt durch fortlaufendes Passagieren ist jedoch Voraussetzung für die Entstehung eines klinischen Krankheitsbildes. Ausnahmen bilden hier die hochpathogenen aviären Viren, einige niedrig pathogene aviäre Viren und das pandemische H1N1 1918 Virus (Dybing et al. 2000; Nishimura et al. 2000; Tumpey et al. 2005; Driskell et al. 2010), welche auch ohne vorherige Adaption schwere Infektionsverläufe in Mäusen hervorrufen.

Ein weiterer Punkt sind Unterschiede zwischen Wild- und Labormäusen. Während die meisten gezüchteten Labormäuse für bestimmte Virusstämme wie den PR8 und den WSN hoch empfänglich sind und nach intranasaler Infektion ein schweres Krankheitsbild mit oft fatalem Ausgang ausbilden, sind Wildmäuse auch gegenüber hohen Infektionsdosen der

gleichen Virusstämme resistent (Haller 1981). Ein Grund dafür ist, dass gewöhnlichen Labormaus-Stämme gegenüber Wildmäusen kein funktionelles Myxovirus Resistance (Mx)-Gen mehr besitzen, welches für das Mx1 Protein (Myxovirus Resistance Protein 1) codiert (Lindenmann 1962; Haller et al. 1987). Diese durch Typ I IFN induzierbare GTPase spielt eine entscheidende Rolle bei der frühen antiviralen Abwehr und ist ein entscheidender Resistenzfaktor gegen Orthomyxoviren (Haller et al. 1979).

Auch zur Untersuchung der MERS-CoV-Infektion eignet sich die Maus kaum. Im Gegensatz zu Primaten ist die Maus für MERS-CoV nicht permissiv (Coleman et al. 2014). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die murine DDP4 keinen funktionellen Rezeptor des MERS-CoV darstellt (Cockrell et al. 2014).

Primaten erlauben auf Grund ihrer geringeren genetischen Distanz zum Menschen eher Rückschlüsse auf die entsprechenden physiologischen Mechanismen beim Menschen. So wurden z.B. *Cynomolgus*-Makaken als Model benutzt, um die Immunantwort auf das pandemische H1N1 Virus von 2009 (Safronetz et al. 2011) und auf H1N1 Virus von 1918 (Kobasa et al. 2007) zu untersuchen. Primatenmodelle sind jedoch nicht nur ethisch umstritten sondern auch sehr aufwendig in Tierhaltung und Durchführung.

Die Verifizierung von Ergebnissen aus Zellkultur- und Tiermodellen in humanen Proben hat demnach eine große Bedeutung. Humane Precision Cut Lung Slices (PCLS) fanden daher unter anderem Anwendung als Modellsystem zur Untersuchung viraler Infektionen in der Lunge (Ebsen et al. 2002; Goris et al. 2009; Dobrescu et al. 2014). Zur Generierung von PCLS wird das Lungengewebe über den Hauptbronchus mit einer speziellen low melting point Agarose befüllt und zur Aushärtung auf 4°C abgekühlt (Placke and Fisher 1987). Die dann mit Hilfe eines speziellen Mikrotoms, dem Krumdieck Tissue Slicer (Krumdieck et al. 1980), generierten 200-500 µm dicken Präzisionsschnitte werden daraufhin in Zellkulturmedium überführt und bei 37°C inkubiert. Die im Gewebe befindliche Agarose verflüssigt sich bei dieser Temperatur und kann durch wiederholtes Wechseln des Mediums ausgewaschen werden. Vorteil der Methode ist die große Oberfläche des Gewebes im Verhältnis zum Gewebevolumen, wodurch eine sehr gute Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet ist. Außerdem können Gewebestücke nahezu identischer Schichtdicke und Größe generiert werden, was die Vergleichbarkeit bei Experimenten erhöht. Ein Nachteil der Methode ist jedoch, dass die Agarose nicht vollständig aus dem Gewebe ausgewaschen werden kann. Während Bronchien und Bronchioli wieder nahezu vollständig befreit werden, verbleibt Agarose in den Alveoli. Dies ist insbesondere problematisch bei Infektionsexperimenten hinsichtlich des zellulären

Tropismus in der Alveole, da der Zugang zum Alveolarepithel blockiert ist. Bisherige Studien, welche, unter Verwendung von PCLS, den zellulären Tropismus respiratorischer Viren in der Lunge von Schweinen oder Mäusen untersuchen, betrachten daher ausschließlich die verschiedenen Zelltypen innerhalb des Bronchialepithels (Abd El Rahman et al. 2010; Meng et al. 2013). Nativ zugeschnittene Lungenproben eignen sich daher eher den zellulären Tropismus von Viren im alveolaren Kompartiment darzustellen.

In dieser Arbeit wurde nativ zugeschnittenes, *ex vivo* kultiviertes humanes Lungengewebe als Modellsystem für virale Infektionen der menschlichen Lunge etabliert. Wie bei PCLS besteht der Vorteil dieses Modells in der Vielzahl der unterschiedlichen im Gewebe enthaltenen Zelltypen und deren Wechselwirkungen. So können z.B. die in den Alveoli vorhandenen Alveolarmakrophagen Infektionen und inflammatorische Prozesse erheblich beeinflussen (Kim et al. 2013; Wang et al. 2013; Schneider et al. 2014). Die strukturelle Integrität des Lungengewebes bleibt zudem weitestgehend erhalten. Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen, sowie die räumliche Anordnung und das zahlenmäßiges Verhältnis der unterschiedlichen Zelltypen entsprechen annähernd der *in vivo*-Situation. Außerdem bietet das Modell die Möglichkeit Patientenproben z.B. nach Alter, Geschlecht oder Vorerkrankungen der entsprechenden Patienten zu gruppieren und somit den Einfluss dieser Faktoren auf Infektionsverläufe zu untersuchen.

Jedoch ist auch das Lungenorganmodell durch bestimmte Faktoren limitiert. So findet die Sauerstoffzufuhr über die Atmung und die Perfusion der Kapillaren nicht mehr statt, was unter anderem zu Prozessen wie Apoptose und Nekrose führen kann. Außerdem ist die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen stark eingeschränkt, da keine kontinuierliche Perfusion des Gewebes mit Medium stattfindet. Die Kultivierungszeit des Gewebes ist somit limitiert. Das Lungengewebe wird zudem direkt über das Medium infiziert und nicht über den natürlichen Infektionsweg mit der Atemluft über Trachea und Bronchien. Außerdem können keine Immunzellen aus der Blutbahn zum Ort der Infektion rekrutiert werden, da das Gewebe isoliert vorliegt. Diese Einschränkungen reduzieren jedoch auch die Komplexität des Modells, da hier lediglich die Immunantwort im isolierten Gewebe untersucht und die Immunreaktion im Gesamtorganismus nicht berücksichtigt wird. Die durch das Modell erhaltenen Daten beschränken sich somit auf eine kleine Wissensseinheit mit jedoch hoher analytischer Aussagekraft. Das für diese Studie verwendete Gewebe stammt zudem in der Regel von Patienten mit Lungenerkrankungen. Die Reaktivität des Gewebes gegenüber Pathogenen und

Stimulation kann sich dementsprechend von der Reaktivität von Gewebe gesunder Patienten unterscheiden.

Das hier etablierte *ex vivo* Lungengewebeinfektionsmodell zeigte sich als geeignet das Infektionsverhalten verschiedener Influenzaviren sowie des neuen MERS-CoV in humanem Lungengewebe zu untersuchen. So konnten Unterschiede hinsichtlich der Replikationseffizienz verschiedener Influenzaviren in der humanen Lunge detektiert werden, was die Situation im Menschen erstaunlich genau widerspiegelte. Zudem war es mittels spektraler Konfokalmikroskopie methodisch erstmalig möglich den zelltyp-spezifischen, subzellulären Nachweis von MERS-CoV- und H5N1-koinfiziertem Gewebe direkt zu vergleichen. So konnten eindeutige Unterschiede zwischen Influenza A Viren und dem neuen MERS-CoV hinsichtlich des zellulären Tropismus herausgearbeitet werden. Während das hochpathogene H5N1 Virus genau wie alle weiteren getesteten Influenzaviren, ungeachtet ihrer unterschiedlichen Pathogenität im Menschen sowie ihrer unterschiedliche Replikationsfähigkeit in der humanen Lunge, im alveolaren Kompartiment ausschließlich Typ II Zellen infizierte, zeigte das MERS-CoV hier einen deutlich breiteren Zelltropismus und infizierte das gesamte Alveolarepithel. Außerdem war es mittels spektraler Konfokalmikroskopie ebenfalls erstmalig möglich einen durch MERS-CoV verursachten apoptotischen alveolaren Epithelzellschaden direkt in der humanen Lunge nachzuweisen.

Die hier durchgeführten Replikationskurven zeigen zudem, dass ein saisonales H3N2 Virus ohne den Zusatz von Trypsin sehr effizient, ähnlich zu einem hochpathogenen H5N1 Virus, in der humanen Lunge repliziert. Dementsprechend müssen in dem *ex vivo* kultivierten Gewebe Trypsin-ähnliche Proteasen vorliegen, welche multizyklische Replikationskurven saisonaler sowie aviärer oder porciner Influenza Viren ohne den Zusatz von exogenem Trypsin erlauben, und somit einen direkten Vergleich der Replikationskinetiken direkt im humanen Gewebe ermöglichen. Pulmonale Zelllinien wie z.B. A549-Zellen benötigen hingegen den Zusatz von Trypsin um eine multizyklische Infektion von Viren ohne multibasische HA-Spaltstelle zu unterstützen. Eine immunhistologische Studie aus dem Jahr 2012 zeigte die Expression von TMPRSS2 (Transmembranprotease Serin 2) und HAT im Bronchialepithel, auf Alveolarmakrophagen und im Alveolarepithel, wobei TMPRSS2 ausschließlich auf Typ II Zellen und HAT gelegentlich auf Typ I und Typ II Zellen detektiert wurde (Bertram et al. 2012). Die Expression der Matriptase konnte ebenfalls im Bronchial- als auch im Alveolarepithel nachgewiesen werden (Oberst et al. 2003). In einer anderen Studie konnte TMPRSS2-RNA mittels Microarray in primären, aus humanem Lungengewebe isolierten, Typ II-ähnlichen

Zellen jedoch nicht in isolierten Alveoarmakrophagen nachgewiesen werden (Wang et al. 2009).

Das Auftreten des SARS-CoV im Jahr 2003 (Drosten et al. 2003), des A(H1N1)pdm 2009 (Perez-Padilla et al. 2009), des neuen Influenza A(H7N9) Virus 2013 (Gao et al. 2013) oder des MERS-CoV 2012 zeigt (Zaki et al. 2012), dass ständig neue Viren die Speziesbarriere zum Menschen überwinden. Diese für das menschliche Immunsystem neuen Viren („emerging viruses“) können zum Teil schwere respiratorische Erkrankungen hervorrufen, was den Bedarf einer zeitnahen Abschätzung der Pathogenität dieser Erreger in menschlichen Lungen zeigt. So kann das hier etablierte *ex vivo* Lungengewebekulturmodell auch zur Untersuchung zukünftig auftretender Viren in humanem Lungengewebe dienen.

Erste experimentelle Ansätze zeigen zudem, dass sich die Zellen im Lungengewebe auch genetisch manipulieren lassen. So konnte mittels Lebendgewebemikroskopie die Expression von GFP-Fusionsproteinen in Alveolarepithelzellen nach adenoviraler Transduktion nachgewiesen werden. Die Expression, Veränderungen in der subzellulären Lokalisation oder auch die Degradation bestimmter Proteine nach Stimulation und/oder Infektion können sich somit in Echtzeit mittels Intravitalmikroskopie verfolgen lassen.

Zur Optimierung des Modells gibt es bereits erste Ansätze. So soll ein spezielles Verfahren entwickelt werden, welches es unter Verwendung von Hochdruck-Wasserstrahltechnik ermöglicht sehr dünne agarosefreie planparallele Schnitte aus peripherem Lungengewebe herzustellen. Die durch die geringe Schnittdicke entstehende große Oberfläche würde eine noch bessere Nähr- und Sauerstoffversorgung der Gewebeschnitte ermöglichen. Zudem wären die Schnittdicken der Gewebestücke deutlich ähnlicher, was die Vergleichbarkeit erhöhen würde. Im Gegensatz zum manuellen Schneideverfahren mit Skalpell und Stanzen könnten hier außerdem mögliche Randrupturen und Quetschungen des Gewebes vermieden werden. Weiterhin soll eine speziell perfundier-, temperier-, und begasbare intravitalmikroskopische Untersuchungskammer für die lebendmikroskopische Untersuchung dieser Gewebeschnitte entwickelt werden. Neben der Fixierung des Gewebes soll diese Kammer auch eine kontinuierliche Perfusion des Gewebes mit Kulturmedium ermöglichen, was die mögliche Kultivierungszeit des Gewebes erheblich verlängern würde. Zudem sollen z.B. über einen unabhängigen speziellen zweiten Zugang Pathogene oder Stimulantien eingebracht und/oder kontinuierlich Proben genommen werden. Das Einbringen der

Pathogene und Stimulantien soll dabei über eine nanoporöse Membran erfolgen, was zu einer gleichmäßigen Einschwemmung der Substanzen ins Gewebe beitragen soll.

Insgesamt bietet das humane *ex vivo* Lungengewebekulturmodell eine sehr gute Grundlage zur Weiterentwicklung.

Literaturverzeichnis

- Abd El Rahman, S., C. Winter, et al. "Differential sensitivity of well-differentiated avian respiratory epithelial cells to infection by different strains of infectious bronchitis virus." *Journal of virology* 2010 84(17): 8949-8952.
- Abdel-Ghafar, A. N., T. Chotpitayasunondh, et al. "Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans." *The New England journal of medicine* 2008 358(3): 261-273.
- Aggarwal, S., B. Bradel-Tretheway, et al. "Biochemical characterization of enzyme fidelity of influenza A virus RNA polymerase complex." *PloS one* 2010 5(4): e10372.
- Aida, S., S. Tamai, et al. "Distribution of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human lung: immunohistochemical and immunoelectron-microscopic studies." *Respiration* 1994 61(3): 161-166.
- Alan Stevens, J. S. L. (1993). *Histology*. St. Louis, Mosby.
- Alexander, D. J. "A review of avian influenza in different bird species." *Veterinary microbiology* 2000 74(1-2): 3-13.
- Andreeva, A. V., M. A. Kutuzov, et al. "Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2007 293(2): L259-271.
- Annan, A., H. J. Baldwin, et al. "Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe." *Emerging infectious diseases* 2013 19(3): 456-459.
- Assiri, A., A. McGeer, et al. "Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus." *The New England journal of medicine* 2013 369(5): 407-416.
- Azhar, E. I., S. A. El-Kafrawy, et al. "Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus." *The New England journal of medicine* 2014 370(26): 2499-2505.
- Balachandran, S., C. N. Kim, et al. "Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling." *The EMBO journal* 1998 17(23): 6888-6902.
- Barkhordari, A., R. W. Stoddart, et al. "Lectin histochemistry of normal human lung." *Journal of molecular histology* 2004 35(2): 147-156.
- Barman, S., A. Ali, et al. "Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses." *Virus research* 2001 77(1): 61-69.
- Baskin, C. R., H. Bielefeldt-Ohmann, et al. "Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009 106(9): 3455-3460.
- Baum, L. G. and J. C. Paulson "Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity." *Acta histochemica. Supplementband* 1990 40: 35-38.
- Bean, W. J., Jr. and R. W. Simpson "Transcriptase activity and genome composition of defective influenza virus." *Journal of virology* 1976 18(1): 365-369.
- Beare, A. S. and R. G. Webster "Replication of avian influenza viruses in humans." *Archives of virology* 1991 119(1-2): 37-42.
- Beaulieu, A., E. Gravel, et al. "Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium." *Journal of virology* 2013 87(8): 4237-4251.
- Belser, J. A., K. M. Gustin, et al. "Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice." *Nature* 2013 501(7468): 556-559.
- Belser, J. A., X. Lu, et al. "DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection." *The Journal of infectious diseases* 2007 196(10): 1493-1499.

- Bermingham, A., M. A. Chand, et al. "Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012." *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2012 17(40): 20290.
- Berry, M., J. Gamielien, et al. "Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium." *Viruses* 2015 7(3): 996-1019.
- Bertram, S., A. Heurich, et al. "Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts." *PloS one* 2012 7(4): e35876.
- Berube, K., Z. Prytherch, et al. "Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models." *Toxicology* 2010 278(3): 311-318.
- Boers, J. E., A. W. Ambergen, et al. "Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium." *Am J Respir Crit Care Med* 1999 159(5 Pt 1): 1585-1591.
- Booth, J. L., K. M. Coggeshall, et al. "Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk." *Journal of virology* 2004 78(8): 4156-4164.
- Boscarino, J. A., H. L. Logan, et al. "Envelope protein palmitoylations are crucial for murine coronavirus assembly." *Journal of virology* 2008 82(6): 2989-2999.
- Bosch, F. X., W. Garten, et al. "Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses." *Virology* 1981 113(2): 725-735.
- Bottcher, E., T. Matrosovich, et al. "Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium." *Journal of virology* 2006 80(19): 9896-9898.
- Bouvier, N. M. and P. Palese "The biology of influenza viruses." *Vaccine* 2008 26 Suppl 4: D49-53.
- Brower, R. G., P. N. Lanken, et al. "Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome." *The New England journal of medicine* 2004 351(4): 327-336.
- Bryant, C. E. and T. P. Monie "Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity." *Open biology* 2012 2(4): 120015.
- Brydon, E. W., H. Smith, et al. "Influenza A virus-induced apoptosis in bronchiolar epithelial (NCI-H292) cells limits pro-inflammatory cytokine release." *The Journal of general virology* 2003 84(Pt 9): 2389-2400.
- Buchholz, U., M. A. Muller, et al. "Contact investigation of a case of human novel coronavirus infection treated in a German hospital, October-November 2012." *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2013 18(8).
- Bui, M., E. G. Wills, et al. "Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins." *Journal of virology* 2000 74(4): 1781-1786.
- Bullough, P. A., F. M. Hughson, et al. "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion." *Nature* 1994 371(6492): 37-43.
- Callebaut, P. E. and M. B. Pensaert "Characterization and isolation of structural polypeptides in haemagglutinating encephalomyelitis virus." *The Journal of general virology* 1980 48(1): 193-204.
- Campbell, A., R. Rodin, et al. "Risk of severe outcomes among patients admitted to hospital with pandemic (H1N1) influenza." *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2010 182(4): 349-355.
- Castranova, V., J. Rabovsky, et al. "The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte." *Toxicol Appl Pharmacol* 1988 93(3): 472-483.

- Castro, C. Y. "ARDS and diffuse alveolar damage: a pathologist's perspective." *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2006 18(1): 13-19.
- Cesario, T. C. "Viruses associated with pneumonia in adults." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012 55(1): 107-113.
- Chaipan, C., D. Kobasa, et al. "Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin." *Journal of virology* 2009 83(7): 3200-3211.
- Chan, J. F., S. K. Lau, et al. "The emerging novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: The "knowns" and "unknowns". " *J Formos Med Assoc* 2013 112(7): 372-381.
- Chan, M. C., C. Y. Cheung, et al. "Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells." *Respiratory research* 2005 6: 135.
- Chan, R. W., M. C. Chan, et al. "DAS181 inhibits H5N1 influenza virus infection of human lung tissues." *Antimicrob Agents Chemother* 2009 53(9): 3935-3941.
- Chen, J. and Y. M. Deng "Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics." *Virology journal* 2009 6: 30.
- Chen, P. C. and C. H. Hsiao "Re: To KF, Tong JH, Chan PK, et al. Tissue and cellular tropism of the coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome: an in-situ hybridization study of fatal cases. *J Pathol* 2004; 202: 157-163." *The Journal of pathology* 2004 203(2): 729-730; author reply 730-721.
- Chen, W., P. A. Calvo, et al. "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." *Nature medicine* 2001 7(12): 1306-1312.
- Chen, Y., W. Liang, et al. "Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome." *Lancet* 2013 381(9881): 1916-1925.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Analytical biochemistry* 1987 162(1): 156-159.
- Chou, Y. Y., R. Vafabakhsh, et al. "One influenza virus particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012 109(23): 9101-9106.
- Chutinimitkul, S., D. van Riel, et al. "In vitro assessment of attachment pattern and replication efficiency of H5N1 influenza A viruses with altered receptor specificity." *Journal of virology* 2010 84(13): 6825-6833.
- Claas, E. C., A. D. Osterhaus, et al. "Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus." *Lancet* 1998 351(9101): 472-477.
- Cockrell, A. S., K. M. Peck, et al. "Mouse dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) is not a functional receptor for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection." *Journal of virology* 2014.
- Colamussi, M. L., M. R. White, et al. "Influenza A virus accelerates neutrophil apoptosis and markedly potentiates apoptotic effects of bacteria." *Blood* 1999 93(7): 2395-2403.
- Coleman, C. M., K. L. Matthews, et al. "Wild-type and innate immune-deficient mice are not susceptible to the Middle East respiratory syndrome coronavirus." *The Journal of general virology* 2014 95(Pt 2): 408-412.
- Collins, A. R., R. L. Knobler, et al. "Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion." *Virology* 1982 119(2): 358-371.
- Compans, R. W., J. Content, et al. "Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus." *Journal of virology* 1972 10(4): 795-800.

- Conenello, G. M., D. Zamarin, et al. "A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence." *PLoS pathogens* 2007 3(10): 1414-1421.
- Corbiere, V., V. Dirix, et al. "Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes." *Respiratory research* 2011 12: 15.
- Crapo, J. D., B. E. Barry, et al. "Cell number and cell characteristics of the normal human lung." *The American review of respiratory disease* 1982 126(2): 332-337.
- Dawood, F. S., S. Jain, et al. "Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans." *The New England journal of medicine* 2009 360(25): 2605-2615.
- de Groot, R. J., S. C. Baker, et al. "Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group." *Journal of virology* 2013 87(14): 7790-7792.
- de Haan, C. A. and P. J. Rottier "Molecular interactions in the assembly of coronaviruses." *Advances in virus research* 2005 64: 165-230.
- de Jong, M. D., C. P. Simmons, et al. "Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia." *Nature medicine* 2006 12(10): 1203-1207.
- Desselberger, U., V. R. Racaniello, et al. "The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity." *Gene* 1980 8(3): 315-328.
- Dhar, R., R. M. Chanock, et al. "Nonviral oligonucleotides at the 5' terminus of cytoplasmic influenza viral mRNA deduced from cloned complete genomic sequences." *Cell* 1980 21(2): 495-500.
- Ding, Y., H. Wang, et al. "The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China." *The Journal of pathology* 2003 200(3): 282-289.
- Dobrescu, I., B. Levast, et al. "In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses." *Veterinary microbiology* 2014 169(1-2): 18-32.
- Dobrovolny, H. M., M. J. Baron, et al. "Exploring cell tropism as a possible contributor to influenza infection severity." *PloS one* 2010 5(11): e13811.
- Donald, H. B. and A. Isaacs "Counts of influenza virus particles." *J Gen Microbiol* 1954 10(3): 457-464.
- Drake, J. W. "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993 90(9): 4171-4175.
- Driskell, E. A., C. A. Jones, et al. "Avian influenza virus isolates from wild birds replicate and cause disease in a mouse model of infection." *Virology* 2010 399(2): 280-289.
- Drosten, C., S. Gunther, et al. "Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome." *The New England journal of medicine* 2003 348(20): 1967-1976.
- Drosten, C., M. Seilmaier, et al. "Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection." *The Lancet infectious diseases* 2013 13(9): 745-751.
- Drosten, C., M. Seilmaier, et al. "Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection." *Lancet Infect Dis* 2013 13(9): 745-751.
- Duan, W. R., D. S. Garner, et al. "Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts." *The Journal of pathology* 2003 199(2): 221-228.

- Dybing, J. K., S. Schultz-Cherry, et al. "Distinct pathogenesis of hong kong-origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses." *Journal of virology* 2000 74(3): 1443-1450.
- Ebsen, M., G. Mogilevski, et al. "Infection of murine precision cut lung slices (PCLS) with respiratory syncytial virus (RSV) and chlamydia pneumoniae using the Krumdieck technique." *Pathology, research and practice* 2002 198(11): 747-753.
- Eierhoff, T., E. R. Hrincius, et al. "The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells." *PLoS pathogens* 2010 6(9): e1001099.
- Ellis, T. M., R. B. Bousfield, et al. "Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002." *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 2004 33(5): 492-505.
- Engelhardt, O. G. and E. Fodor "Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection." *Reviews in medical virology* 2006 16(5): 329-345.
- Estenssoro, E., A. Dubin, et al. "Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome." *Critical care medicine* 2002 30(11): 2450-2456.
- FAO, F. a. A. O. o. t. U. N. (2011) "Approaches to controlling, preventing and eliminating H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza in endemic countries." *Animal Production and Health Paper* **171**.
- Fehrenbach, H. "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." *Respiratory research* 2001 2(1): 33-46.
- Fernandez, I. E. and O. Eickelberg "New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis." *Lancet* 2012 380(9842): 680-688.
- Finch, R. "Community-acquired pneumonia: the evolving challenge." *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001 7 Suppl 3: 30-38.
- Fodor, E. "The RNA polymerase of influenza a virus: mechanisms of viral transcription and replication." *Acta Virol* 2013 57(2): 113-122.
- Fodor, E., D. C. Pritlove, et al. "The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription." *Journal of virology* 1994 68(6): 4092-4096.
- Franks, T. J., P. Y. Chong, et al. "Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore." *Human pathology* 2003 34(8): 743-748.
- Fujii, Y., H. Goto, et al. "Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003 100(4): 2002-2007.
- Fujimoto, I., T. Takizawa, et al. "Co-expression of Fas and Fas-ligand on the surface of influenza virus-infected cells." *Cell death and differentiation* 1998 5(5): 426-431.
- Fujino, N., H. Kubo, et al. "Increased severity of 2009 pandemic influenza A virus subtype H1N1 infection in alveolar type II cells from patients with pulmonary fibrosis." *The Journal of infectious diseases* 2013 207(4): 692-693.
- Gambaryan, A., R. Webster, et al. "Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken." *Archives of virology* 2002 147(6): 1197-1208.
- Gao, H. N., H. Z. Lu, et al. "Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection." *The New England journal of medicine* 2013 368(24): 2277-2285.
- Gao, R., J. Bhatnagar, et al. "Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1): role of the host immune response in pathogenesis." *The American journal of pathology* 2013 183(4): 1258-1268.
- Gao, R., B. Cao, et al. "Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus." *The New England journal of medicine* 2013 368(20): 1888-1897.

- Geller, C., M. Varbanov, et al. "Human coronaviruses: insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies." *Viruses* 2012 4(11): 3044-3068.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, et al. "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." *Journal of the National Cancer Institute* 1973 51(5): 1417-1423.
- Gil, J. and M. Esteban "Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action." *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2000 5(2): 107-114.
- Glaser, L., J. Stevens, et al. "A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity." *Journal of virology* 2005 79(17): 11533-11536.
- Gorbalenya, A. E., L. Enjuanes, et al. "Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome." *Virus research* 2006 117(1): 17-37.
- Goris, K., S. Uhlenbruck, et al. "Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection." *Journal of virology* 2009 83(4): 1962-1968.
- Gown, A. M. and M. C. Willingham "Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3." *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2002 50(4): 449-454.
- Grabowska, K., L. Hogberg, et al. "Occurrence of invasive pneumococcal disease and number of excess cases due to influenza." *BMC infectious diseases* 2006 6: 58.
- Graham, R. L., E. F. Donaldson, et al. "A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses." *Nature reviews. Microbiology* 2013 11(12): 836-848.
- Gu, J., E. Gong, et al. "Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS." *The Journal of experimental medicine* 2005 202(3): 415-424.
- Gu, J. and C. Korteweg "Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome." *The American journal of pathology* 2007 170(4): 1136-1147.
- Gu, J., Z. Xie, et al. "H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study." *Lancet* 2007 370(9593): 1137-1145.
- Guery, B., J. Poissy, et al. "Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission." *Lancet* 2013 381(9885): 2265-2272.
- Guo, C. T., N. Takahashi, et al. "The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors." *Glycobiology* 2007 17(7): 713-724.
- Guy, J. S., J. J. Breslin, et al. "Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal." *Journal of clinical microbiology* 2000 38(12): 4523-4526.
- Haller, O. "Inborn resistance of mice to orthomyxoviruses." *Current topics in microbiology and immunology* 1981 92: 25-52.
- Haller, O., M. Acklin, et al. "Influenza virus resistance of wild mice: wild-type and mutant Mx alleles occur at comparable frequencies." *J Interferon Res* 1987 7(5): 647-656.
- Haller, O., H. Arnheiter, et al. "Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice." *The Journal of experimental medicine* 1979 149(3): 601-612.
- Hatta, M., P. Gao, et al. "Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses." *Science* 2001 293(5536): 1840-1842.
- Helenius, A. "Unpacking the incoming influenza virus." *Cell* 1992 69(4): 577-578.
- Herold, S., M. Steinmueller, et al. "Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand." *The Journal of experimental medicine* 2008 205(13): 3065-3077.

- Hinshaw, V. S., C. W. Olsen, et al. "Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses." *Journal of virology* 1994 68(6): 3667-3673.
- Hirst, G. K. "Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza." *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1962 27: 303-309.
- Hodgson, U., V. Pulkkinen, et al. "ELMOD2 is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis." *American journal of human genetics* 2006 79(1): 149-154.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka "Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus." *Journal of virology* 1994 68(5): 3120-3128.
- Horimoto, T., K. Nakayama, et al. "Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses." *Journal of virology* 1994 68(9): 6074-6078.
- Hutchinson, E. C., M. D. Curran, et al. "Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus." *Journal of virology* 2008 82(23): 11869-11879.
- Ibricevic, A., A. Pekosz, et al. "Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells." *Journal of virology* 2006 80(15): 7469-7480.
- Inglis, S. C. and C. M. Brown "Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus." *Nucleic acids research* 1981 9(12): 2727-2740.
- Inglis, S. C., M. J. Gething, et al. "Relationship between the messenger RNAs transcribed from two overlapping genes of influenza virus." *Nucleic acids research* 1980 8(16): 3575-3589.
- Irfan, M., J. Farooqi, et al. "Community-acquired pneumonia." *Current opinion in pulmonary medicine* 2013 19(3): 198-208.
- Irvin, C. G. and J. H. Bates "Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size." *Respiratory research* 2003 4: 4.
- Ithete, N. L., S. Stoffberg, et al. "Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa." *Emerging infectious diseases* 2013 19(10): 1697-1699.
- Itoh, Y., K. Shinya, et al. "In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses." *Nature* 2009 460(7258): 1021-1025.
- Jiang, L., N. Wang, et al. "Potent neutralization of MERS-CoV by human neutralizing monoclonal antibodies to the viral spike glycoprotein." *Sci Transl Med* 2014 6(234): 234ra259.
- Jones, I. M., P. A. Reay, et al. "Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2." *The EMBO journal* 1986 5(9): 2371-2376.
- Jorens, P. G., Y. Sibille, et al. "Potential role of Clara cell protein, an endogenous phospholipase A2 inhibitor, in acute lung injury." *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1995 8(10): 1647-1653.
- Kageyama, T., S. Fujisaki, et al. "Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013." *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2013 18(15): 20453.
- Karlas, A., N. Machuy, et al. "Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication." *Nature* 2010 463(7282): 818-822.
- Kates, M., A. C. Allison, et al. "Origin of lipids in influenza virus." *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1962 27: 293-301.
- Kawaoka, Y., S. Krauss, et al. "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics." *Journal of virology* 1989 63(11): 4603-4608.

- Keawcharoen, J., D. van Riel, et al. "Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1)." *Emerging infectious diseases* 2008 14(4): 600-607.
- Kido, H., Y. Okumura, et al. "Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses." *Journal of molecular and genetic medicine : an international journal of biomedical research* 2008 3(1): 167-175.
- Kim, H. M., Y. M. Kang, et al. "The severe pathogenicity of alveolar macrophage-depleted ferrets infected with 2009 pandemic H1N1 influenza virus." *Virology* 2013 444(1-2): 394-403.
- Kim, H. M., Y. W. Lee, et al. "Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs." *Journal of virology* 2008 82(9): 4265-4274.
- Kimble, B., G. R. Nieto, et al. "Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species." *Virology journal* 2010 7: 365.
- Kingsbury, D. W. "Replication and functions of myxovirus ribonucleic acids." *Prog Med Virol* 1970 12: 49-77.
- Klempner, M. S. and D. S. Shapiro "Crossing the species barrier--one small step to man, one giant leap to mankind." *The New England journal of medicine* 2004 350(12): 1171-1172.
- Klenk, H. D. and W. Garten "Host cell proteases controlling virus pathogenicity." *Trends in microbiology* 1994 2(2): 39-43.
- Klenk, H. D., R. Rott, et al. "Activation of influenza A viruses by trypsin treatment." *Virology* 1975 68(2): 426-439.
- Knepper, J., K. L. Schierhorn, et al. "The novel human influenza A(H7N9) virus is naturally adapted to efficient growth in human lung tissue." *mBio* 2013 4(5): e00601-00613.
- Knibbs, R. N., I. J. Goldstein, et al. "Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leukoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins." *The Journal of biological chemistry* 1991 266(1): 83-88.
- Kobasa, D., S. M. Jones, et al. "Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus." *Nature* 2007 445(7125): 319-323.
- Konami, Y., K. Yamamoto, et al. "Strong affinity of *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) for sialic acid-containing Ser/Thr-linked carbohydrate chains of N-terminal octapeptides from human glycophorin A." *FEBS Lett* 1994 342(3): 334-338.
- Konig, R., S. Stertz, et al. "Human host factors required for influenza virus replication." *Nature* 2010 463(7282): 813-817.
- Korst, R. J., B. Bewig, et al. "In vitro and in vivo transfer and expression of human surfactant SP-A- and SP-B-associated protein cDNAs mediated by replication-deficient, recombinant adenoviral vectors." *Human gene therapy* 1995 6(3): 277-287.
- Krumdieck, C. L., J. E. dos Santos, et al. "A new instrument for the rapid preparation of tissue slices." *Analytical biochemistry* 1980 104(1): 118-123.
- Kung, H. C., K. F. Jen, et al. "Influenza in China in 1977: recurrence of influenzavirus A subtype H1N1." *Bulletin of the World Health Organization* 1978 56(6): 913-918.
- Kuznetsova, I., A. P. Shurygina, et al. "Adaptive mutation in nuclear export protein allows stable transgene expression in a chimaeric influenza A virus vector." *The Journal of general virology* 2014 95(Pt 2): 337-349.
- Labadie, K., E. Dos Santos Afonso, et al. "Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells." *Virology* 2007 362(2): 271-282.
- Lamb, R. A. and P. W. Choppin "The gene structure and replication of influenza virus." *Annual review of biochemistry* 1983 52: 467-506.

- Lamb, R. A. and C. J. Lai "Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus." *Cell* 1980 21(2): 475-485.
- Lau, S. K., P. C. Woo, et al. "Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005 102(39): 14040-14045.
- Lazarowitz, S. G. and P. W. Choppin "Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide." *Virology* 1975 68(2): 440-454.
- Li, J., E. Gao, et al. "Cyclic AMP-responsive expression of the surfactant protein-A gene is mediated by increased DNA binding and transcriptional activity of thyroid transcription factor-1." *The Journal of biological chemistry* 1998 273(8): 4592-4600.
- Li, W., Z. Shi, et al. "Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses." *Science* 2005 310(5748): 676-679.
- Li, Z., H. Chen, et al. "Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model." *Journal of virology* 2005 79(18): 12058-12064.
- Liao, Y., Q. Yuan, et al. "Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein." *Virology* 2006 349(2): 264-275.
- Lindenmann, J. "Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus." *Virology* 1962 16: 203-204.
- Liu, D., W. Shi, et al. "Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses." *Lancet* 2013 381(9881): 1926-1932.
- Liu, J., H. Xiao, et al. "Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds." *Science* 2005 309(5738): 1206.
- Liu, Y., S. G. Paquette, et al. "The Third Wave: H7N9 Endemic Reassortant Viruses and Patient Clusters." *Journal of infection in developing countries* 2015 9(2): 122-127.
- Ludwig, S., O. Planz, et al. "Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy?" *Trends in molecular medicine* 2003 9(2): 46-52.
- Lukas Bubendorf, G. E. F., Ellen C Obermann, Peter Dalquen (2010). *Pathologie: Zytopathologie*, Springer. **Band 8**.
- MacCallum, N. S. and T. W. Evans "Epidemiology of acute lung injury." *Current opinion in critical care* 2005 11(1): 43-49.
- Madin, S. H. and N. B. Darby, Jr. "Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 1958 98(3): 574-576.
- Maines, T. R., A. Jayaraman, et al. "Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice." *Science* 2009 325(5939): 484-487.
- Marcus, P. I., J. M. Ngunjiri, et al. "Dynamics of biologically active subpopulations of influenza virus: plaque-forming, noninfectious cell-killing, and defective interfering particles." *Journal of virology* 2009 83(16): 8122-8130.
- Martin, C., S. Uhlig, et al. "Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices." *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1996 9(12): 2479-2487.
- Martin, K. and A. Helenius "Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import." *Cell* 1991 67(1): 117-130.
- Mason, R. J. and M. C. Williams "Phospholipid composition and ultrastructure of A549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin." *Biochimica et biophysica acta* 1980 617(1): 36-50.

- Masters, P. S. "The molecular biology of coronaviruses." *Advances in virus research* 2006 66: 193-292.
- Matlin, K. S., H. Reggio, et al. "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line." *The Journal of cell biology* 1981 91(3 Pt 1): 601-613.
- Matrosovich, M. N., A. S. Gambaryan, et al. "Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site." *Virology* 1997 233(1): 224-234.
- Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, et al. "Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 101(13): 4620-4624.
- Matthay, M. A., L. B. Ware, et al. "The acute respiratory distress syndrome." *J Clin Invest* 2012 122(8): 2731-2740.
- Matthay, M. A., L. B. Ware, et al. "The acute respiratory distress syndrome." *The Journal of clinical investigation* 2012 122(8): 2731-2740.
- Matthay, M. A. and G. A. Zimmerman "Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2005 33(4): 319-327.
- Medina, R. A. and A. Garcia-Sastre "Influenza A viruses: new research developments." *Nature reviews. Microbiology* 2011 9(8): 590-603.
- Melen, K., R. Fagerlund, et al. "Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein." *The Journal of biological chemistry* 2003 278(30): 28193-28200.
- Memish, Z. A., A. I. Zumla, et al. "Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections." *The New England journal of medicine* 2013 368(26): 2487-2494.
- Mendieta, L., T. Tarrago, et al. "Recent patents of dipeptidyl peptidase IV inhibitors." *Expert opinion on therapeutic patents* 2011 21(11): 1693-1741.
- Meng, F., D. Punyadarsaniya, et al. "Replication characteristics of swine influenza viruses in precision-cut lung slices reflect the virulence properties of the viruses." *Vet Res* 2013 44(1): 110.
- Mertz, D., T. H. Kim, et al. "Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis." *BMJ* 2013 347: f5061.
- Mestas, J. and C. C. Hughes "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." *J Immunol* 2004 172(5): 2731-2738.
- Meyer, B., M. A. Muller, et al. "Antibodies against MERS Coronavirus in Dromedary Camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013." *Emerging infectious diseases* 2014 20(4): 552-559.
- Milne-Price, S., K. L. Miazgowiec, et al. "The emergence of the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV)." *Pathog Dis* 2014.
- Mok, C. K., H. H. Lee, et al. "Pathogenicity of the novel A/H7N9 influenza virus in mice." *mBio* 2013 4(4).
- Mori, I., T. Komatsu, et al. "In vivo induction of apoptosis by influenza virus." *The Journal of general virology* 1995 76 (Pt 11): 2869-2873.
- Mossel, E. C., J. Wang, et al. "SARS-CoV replicates in primary human alveolar type II cell cultures but not in type I-like cells." *Virology* 2008 372(1): 127-135.
- Muller, M. A., V. S. Raj, et al. "Human coronavirus EMC does not require the SARS-coronavirus receptor and maintains broad replicative capability in mammalian cell lines." *mBio* 2012 3(6).
- Munster, V. J., E. de Wit, et al. "Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets." *Science* 2009 325(5939): 481-483.

- Myers, K. P., C. W. Olsen, et al. "Cases of swine influenza in humans: a review of the literature." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2007 44(8): 1084-1088.
- Nakajima, K., U. Desselberger, et al. "Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950." *Nature* 1978 274(5669): 334-339.
- Nakajima, K. and A. Sugiura "Three-factor cross of influenza virus." *Virology* 1977 81(2): 486-489.
- Narasaraju, T., M. K. Sim, et al. "Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis." *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2009 11(1): 2-11.
- Nath, S. T. and D. P. Nayak "Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1)." *Molecular and cellular biology* 1990 10(8): 4139-4145.
- Nayak, D. P., E. K. Hui, et al. "Assembly and budding of influenza virus." *Virus research* 2004 106(2): 147-165.
- Neumann, G., G. G. Brownlee, et al. "Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation." *Current topics in microbiology and immunology* 2004 283: 121-143.
- Neumann, G., M. T. Hughes, et al. "Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1." *The EMBO journal* 2000 19(24): 6751-6758.
- Neumann, G. and Y. Kawaoka "The first influenza pandemic of the new millennium." *Influenza and other respiratory viruses* 2011 5(3): 157-166.
- Nguyen-Van-Tam, J. S., P. J. Openshaw, et al. "Risk factors for hospitalisation and poor outcome with pandemic A/H1N1 influenza: United Kingdom first wave (May-September 2009)." *Thorax* 2010 65(7): 645-651.
- Nicholls, J. M., A. J. Bourne, et al. "Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses." *Respiratory research* 2007 8: 73.
- Nichols, J. E., J. A. Niles, et al. "Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus." *Journal of virology* 2001 75(13): 5921-5929.
- Nishimura, H., S. Itamura, et al. "Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection." *The Journal of general virology* 2000 81(Pt 10): 2503-2510.
- Noda, T., H. Sagara, et al. "Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles." *Nature* 2006 439(7075): 490-492.
- O'Neill, R. E., R. Jaskunas, et al. "Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import." *The Journal of biological chemistry* 1995 270(39): 22701-22704.
- O'Neill, R. E., J. Talon, et al. "The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins." *The EMBO journal* 1998 17(1): 288-296.
- Oberst, M. D., B. Singh, et al. "Characterization of matriptase expression in normal human tissues." *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2003 51(8): 1017-1025.
- Oh, D. Y. and A. C. Hurt "A Review of the Antiviral Susceptibility of Human and Avian Influenza Viruses over the Last Decade." *Scientifica* 2014 2014: 430629.
- Palese, P., K. Tobita, et al. "Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase." *Virology* 1974 61(2): 397-410.
- Patel, J. R., H. A. Davies, et al. "Infection of a calf with the enteric coronavirus strain Paris." *Archives of virology* 1982 73(3-4): 319-327.

- Peiris, J. S., C. M. Chu, et al. "Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study." *Lancet* 2003 361(9371): 1767-1772.
- Peiris, J. S., Y. Guan, et al. "Severe acute respiratory syndrome." *Nature medicine* 2004 10(12 Suppl): S88-97.
- Peiris, J. S., W. C. Yu, et al. "Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease." *Lancet* 2004 363(9409): 617-619.
- Perera, R. A., P. Wang, et al. "Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013." *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2013 18(36): pii=20574.
- Perez-Padilla, R., D. de la Rosa-Zamboni, et al. "Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico." *The New England journal of medicine* 2009 361(7): 680-689.
- Pillai, S. P. and C. W. Lee "Species and age related differences in the type and distribution of influenza virus receptors in different tissues of chickens, ducks and turkeys." *Virology journal* 2010 7: 5.
- Pinto, L. H., L. J. Holsinger, et al. "Influenza virus M2 protein has ion channel activity." *Cell* 1992 69(3): 517-528.
- Placke, M. E. and G. L. Fisher "Adult peripheral lung organ culture--a model for respiratory tract toxicology." *Toxicol Appl Pharmacol* 1987 90(2): 284-298.
- Plotch, S. J., M. Bouloy, et al. "A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription." *Cell* 1981 23(3): 847-858.
- Pulkkinen, V., S. Bruce, et al. "ELMOD2, a candidate gene for idiopathic pulmonary fibrosis, regulates antiviral responses." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010 24(4): 1167-1177.
- Raj, V. S., H. Mou, et al. "Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC." *Nature* 2013 495(7440): 251-254.
- Ramsey, C. and A. Kumar "H1N1: viral pneumonia as a cause of acute respiratory distress syndrome." *Current opinion in critical care* 2011 17(1): 64-71.
- Read, E. K. and P. Digard "Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export." *The Journal of general virology* 2010 91(Pt 5): 1290-1301.
- Reinhold, D., U. Bank, et al. "DP IV/CD26, APN/CD13 and related enzymes as regulators of T cell immunity: implications for experimental encephalomyelitis and multiple sclerosis." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008 13: 2356-2363.
- Reusken, C. B., B. L. Haagmans, et al. "Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study." *Lancet Infect Dis* 2013 13(10): 859-866.
- Rimmelzwaan, G. F., T. Kuiken, et al. "Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model." *Journal of virology* 2001 75(14): 6687-6691.
- RKI. (2011). "Influenza (Saisonale Influenza, Influenza A(H1N1) 2009, Aviäre Influenza)
- " RKI-Ratgeber für Ärzte, from
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza.html.
- RKI. (2014). "Epidemiologie." from
http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/Pandemieplanung/Downloads/Pandemieplan_2014_Teil_II_Epidemiologie.pdf?__blob=publicationFile.

- Rodgers, B. C. and C. A. Mims "Influenza virus replication in human alveolar macrophages." *Journal of medical virology* 1982 9(3): 177-184.
- Rogers, G. N. and J. C. Paulson "Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin." *Virology* 1983 127(2): 361-373.
- Rogers, G. N., J. C. Paulson, et al. "Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity." *Nature* 1983 304(5921): 76-78.
- Rossman, J. S. and R. A. Lamb "Influenza virus assembly and budding." *Virology* 2011 411(2): 229-236.
- Rothberg, M. B., S. D. Haessler, et al. "Complications of viral influenza." *Am J Med* 2008 121(4): 258-264.
- Rott, R., H. D. Klenk, et al. "Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity." *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995 152(4 Pt 2): S16-19.
- Rubenfeld, G. D., E. Caldwell, et al. "Incidence and outcomes of acute lung injury." *The New England journal of medicine* 2005 353(16): 1685-1693.
- Ruuskanen, O., E. Lahti, et al. "Viral pneumonia." *Lancet* 2011 377(9773): 1264-1275.
- Safronetz, D., B. Rockx, et al. "Pandemic swine-origin H1N1 influenza A virus isolates show heterogeneous virulence in macaques." *Journal of virology* 2011 85(3): 1214-1223.
- Sakai, T., M. Ohuchi, et al. "Dual wavelength imaging allows analysis of membrane fusion of influenza virus inside cells." *Journal of virology* 2006 80(4): 2013-2018.
- Sawicki, S. G. and D. L. Sawicki "Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis." *Journal of virology* 1990 64(3): 1050-1056.
- Sawicki, S. G. and D. L. Sawicki "Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands." *Advances in experimental medicine and biology* 1995 380: 499-506.
- Sawicki, S. G. and D. L. Sawicki "A new model for coronavirus transcription." *Advances in experimental medicine and biology* 1998 440: 215-219.
- Sawicki, S. G. and D. L. Sawicki "Coronavirus transcription: a perspective." *Current topics in microbiology and immunology* 2005 287: 31-55.
- Schneider, C., S. P. Nobs, et al. "Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection." *PLoS pathogens* 2014 10(4): e1004053.
- Schneider, J. and T. Wolff "Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: do they play a role in viral mRNA export?" *Vaccine* 2009 27(45): 6312-6316.
- Scholtissek, C., W. Rohde, et al. "On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2." *Virology* 1978 87(1): 13-20.
- Schultz-Cherry, S. and V. S. Hinshaw "Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta." *Journal of virology* 1996 70(12): 8624-8629.
- Senne, D. A., B. Panigrahy, et al. "Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential." *Avian diseases* 1996 40(2): 425-437.
- Shanks, G. D. and J. F. Brundage "Pathogenic responses among young adults during the 1918 influenza pandemic." *Emerging infectious diseases* 2012 18(2): 201-207.
- Shi, Y., W. Zhang, et al. "Structures and receptor binding of hemagglutinins from human-infecting H7N9 influenza viruses." *Science* 2013 342(6155): 243-247.
- Shijubo, N., I. Kawabata, et al. "Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/ uteroglobin (secretoglobin 1A1)." *Curr Pharm Des* 2003 9(14): 1139-1149.
- Shin, J. W., G. Jurisic, et al. "Lymphatic-specific expression of dipeptidyl peptidase IV and its dual role in lymphatic endothelial function." *Experimental cell research* 2008 314(16): 3048-3056.

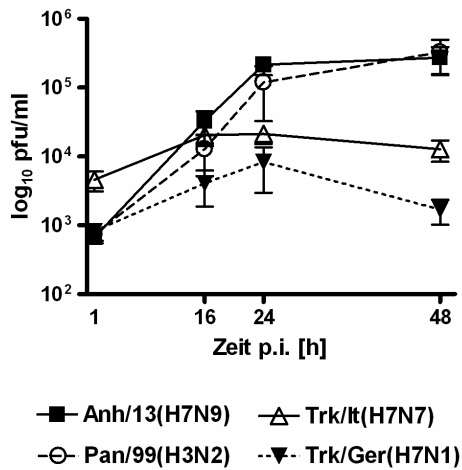
- Shinya, K., M. Ebina, et al. "Avian flu: influenza virus receptors in the human airway." *Nature* 2006 440(7083): 435-436.
- Sirinonthanawech, N., M. Uiprasertkul, et al. "Viral load of the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in infected human tissues." *Journal of medical virology* 2011 83(8): 1418-1423.
- Skehel, J. J., P. M. Bayley, et al. "Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982 79(4): 968-972.
- Smith, G. L., J. Z. Levin, et al. "Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses." *Virology* 1987 160(2): 336-345.
- Soepandi, P. Z., E. Burhan, et al. "Clinical course of avian influenza A(H5N1) in patients at the Persahabatan Hospital, Jakarta, Indonesia, 2005-2008." *Chest* 2010 138(3): 665-673.
- Sonnberg, S., R. J. Webby, et al. "Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1." *Virus research* 2013 178(1): 63-77.
- Stadler, K., V. Masignani, et al. "SARS--beginning to understand a new virus." *Nature reviews. Microbiology* 2003 1(3): 209-218.
- Stevens, J., O. Blixt, et al. "Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities." *Journal of molecular biology* 2006 355(5): 1143-1155.
- Stieneke-Grober, A., M. Vey, et al. "Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease." *The EMBO journal* 1992 11(7): 2407-2414.
- Sturm-Ramirez, K. M., T. Ellis, et al. "Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks." *Journal of virology* 2004 78(9): 4892-4901.
- Sturman, L. S., K. V. Holmes, et al. "Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid." *Journal of virology* 1980 33(1): 449-462.
- Subbarao, K., A. Klimov, et al. "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness." *Science* 1998 279(5349): 393-396.
- Sugiyama, K. and Y. Amano "Morphological and biological properties of a new coronavirus associated with diarrhea in infant mice." *Archives of virology* 1981 67(3): 241-251.
- Sugrue, R. J. and A. J. Hay "Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel." *Virology* 1991 180(2): 617-624.
- Swayne, D. E. and D. L. Suarez "Highly pathogenic avian influenza." *Revue scientifique et technique* 2000 19(2): 463-482.
- Takizawa, T., S. Matsukawa, et al. "Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells." *The Journal of general virology* 1993 74 (Pt 11): 2347-2355.
- Tang, X. C., S. S. Agnihothram, et al. "Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014 111(19): E2018-2026.
- Tao, X., T. E. Hill, et al. "Bilateral entry and release of Middle East respiratory syndrome coronavirus induces profound apoptosis of human bronchial epithelial cells." *Journal of virology* 2013 87(17): 9953-9958.
- Taubenberger, J. K. and D. M. Morens "The pathology of influenza virus infections." *Annual review of pathology* 2008 3: 499-522.
- The Who Mers-Cov Research, G. "State of Knowledge and Data Gaps of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Humans." *PLoS currents* 2013 5.
- To, K. F., P. K. Chan, et al. "Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus." *Journal of medical virology* 2001 63(3): 242-246.

- Tran, T. H., T. L. Nguyen, et al. "Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam." *The New England journal of medicine* 2004 350(12): 1179-1188.
- Tsang, K. W., P. L. Ho, et al. "A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong." *The New England journal of medicine* 2003 348(20): 1977-1985.
- Tumpey, T. M., A. Garcia-Sastre, et al. "Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice." *Journal of virology* 2005 79(23): 14933-14944.
- Tumpey, T. M., A. Garcia-Sastre, et al. "Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice." *J Virol* 2005 79(23): 14933-14944.
- Uiprasertkul, M., R. Kitphati, et al. "Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans." *Emerging infectious diseases* 2007 13(5): 708-712.
- Uiprasertkul, M., P. Puthavathana, et al. "Influenza A H5N1 replication sites in humans." *Emerging infectious diseases* 2005 11(7): 1036-1041.
- Ungchusak, K., P. Auewarakul, et al. "Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1)." *The New England journal of medicine* 2005 352(4): 333-340.
- van Boheemen, S., M. de Graaf, et al. "Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans." *mBio* 2012 3(6).
- van Riel, D., L. M. Leijten, et al. "Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction." *PLoS pathogens* 2011 7(6): e1002099.
- van Riel, D., V. J. Munster, et al. "H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract." *Science* 2006 312(5772): 399.
- van Riel, D., V. J. Munster, et al. "Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals." *The American journal of pathology* 2007 171(4): 1215-1223.
- Veit, M. and M. F. Schmidt "Timing of palmitoylation of influenza virus hemagglutinin." *FEBS Lett* 1993 336(2): 243-247.
- Vey, M., M. Orlich, et al. "Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R." *Virology* 1992 188(1): 408-413.
- Vijaykrishna, D., G. J. Smith, et al. "Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses." *Journal of virology* 2007 81(8): 4012-4020.
- Villar, J., J. Blanco, et al. "The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation." *Intensive care medicine* 2011 37(12): 1932-1941.
- Wan, H. and D. R. Perez "Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses." *Virology* 2006 346(2): 278-286.
- Wang, H., Z. Feng, et al. "Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China." *Lancet* 2008 371(9622): 1427-1434.
- Wang, J., F. Li, et al. "Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages." *Nature communications* 2013 4: 2106.
- Wang, J., R. Oberley-Deegan, et al. "Differentiated human alveolar type II cells secrete antiviral IL-29 (IFN-lambda 1) in response to influenza A infection." *Journal of immunology* 2009 182(3): 1296-1304.
- Wang, P., P. Palese, et al. "The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal." *Journal of virology* 1997 71(3): 1850-1856.

- Wang, W. C. and R. D. Cummings "The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues." *The Journal of biological chemistry* 1988 263(10): 4576-4585.
- Ware, L. B. and M. A. Matthay "The acute respiratory distress syndrome." *The New England journal of medicine* 2000 342(18): 1334-1349.
- Watanabe, T., M. Kiso, et al. "Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans." *Nature* 2013 501(7468): 551-555.
- Watanabe, Y., M. S. Ibrahim, et al. "The changing nature of avian influenza A virus (H5N1)." *Trends in microbiology* 2012 20(1): 11-20.
- Weber, F., G. Kochs, et al. "A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins." *Virology* 1998 250(1): 9-18.
- Webster, R. G., W. J. Bean, et al. "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiological reviews* 1992 56(1): 152-179.
- Webster, R. G. and E. A. Govorkova "H5N1 influenza--continuing evolution and spread." *The New England journal of medicine* 2006 355(21): 2174-2177.
- Webster, R. G., M. Yakhno, et al. "Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks." *Virology* 1978 84(2): 268-278.
- Weinheimer, V. K., A. Becher, et al. "Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung." *The Journal of infectious diseases* 2012 206(11): 1685-1694.
- Weis, W., J. H. Brown, et al. "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid." *Nature* 1988 333(6172): 426-431.
- Weiss, S. R. and J. L. Leibowitz "Coronavirus pathogenesis." *Advances in virus research* 2011 81: 85-164.
- Welsch, D. (2010). *Lehrbuch Histologie*. München, Urban & Fischer.
- Welte, T., A. Torres, et al. "Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe." *Thorax* 2012 67(1): 71-79.
- Whittaker, G. R. "Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine." *Expert reviews in molecular medicine* 2001 2001: 1-13.
- WHO. (2003). from http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html.
- WHO "Fact sheet N°211." 2003.
- WHO. (2012). from http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20120810CumulativeNumberH5N1cases.pdf.
- WHO. (2014). "A (H1N1) seasonal influenza virus: guidance on prevention and treatment." from <http://www.emro.who.int/egy/egypt-news/a-h1n1-is-a-seasonal-influenza-virus-guidance-on-prevention-and-treatment.html>.
- WHO. (2014). "Influenza (Seasonal) Fact sheet N°211." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
- Wiley, D. C., I. A. Wilson, et al. "Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation." *Nature* 1981 289(5796): 373-378.
- Wohlsen, A., C. Martin, et al. "The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices." *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2003 21(6): 1024-1032.
- Wood, G. W., J. W. McCauley, et al. "Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes." *Archives of virology* 1993 130(1-2): 209-217.
- Wurzer, W. J., O. Planz, et al. "Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation." *The EMBO journal* 2003 22(11): 2717-2728.

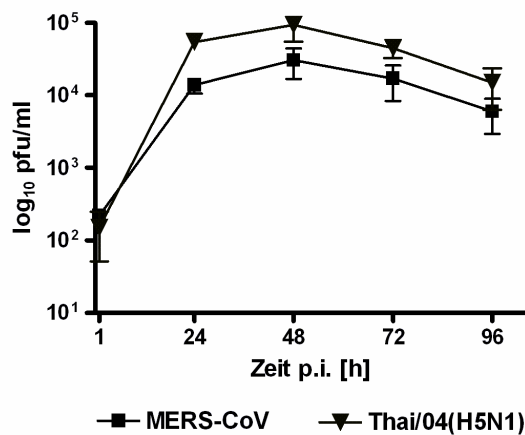
- Xu, X., Subbarao, et al. "Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong." *Virology* 1999 261(1): 15-19.
- Yao, L., C. Korteweg, et al. "Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008 22(3): 733-740.
- Yasuda, J., S. Nakada, et al. "Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix." *Virology* 1993 196(1): 249-255.
- Ying, T., L. Du, et al. "Exceptionally potent neutralization of Middle East respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies." *Journal of virology* 2014 88(14): 7796-7805.
- Yu, H., Z. Gao, et al. "Clinical characteristics of 26 human cases of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infection in China." *PloS one* 2008 3(8): e2985.
- Yu, W. C., R. W. Chan, et al. "Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses." *Journal of virology* 2011 85(14): 6844-6855.
- Yu, X., W. Bi, et al. "Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein." *Virology* 1994 202(2): 1018-1023.
- Yuen, K. Y., P. K. Chan, et al. "Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus." *Lancet* 1998 351(9101): 467-471.
- Zaki, A. M., S. van Boheemen, et al. "Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia." *The New England journal of medicine* 2012 367(19): 1814-1820.
- Zarocostas, J. "H1N1 pandemic flu found to cause viral pneumonia in severe cases, says WHO." *BMJ* 2009 339: b4313.
- Zebedee, S. L. and R. A. Lamb "Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions." *Journal of virology* 1988 62(8): 2762-2772.
- Zhou, J., D. Wang, et al. "Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus." *Nature* 2013 499(7459): 500-503.
- Zhu, H., D. Wang, et al. "Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs." *Science* 2013 341(6142): 183-186.

Anhang



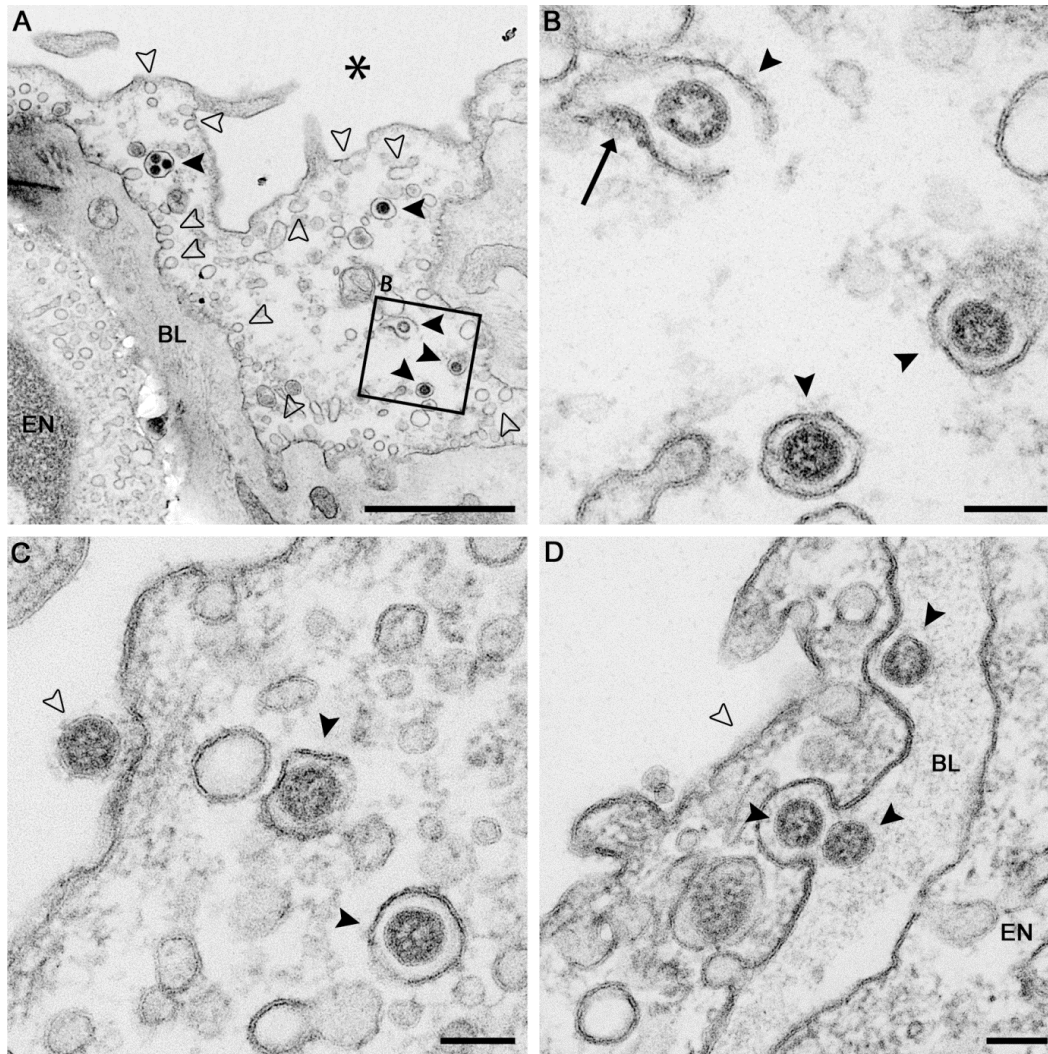
Anhang 1: Replikation des neuen Influenza A (H7N9) Virus in *ex vivo* infiziertem humanem Lungengewebe.

Humane Lungengewebeproben wurden mit den angegebenen Viren (4×10^6 pfu) für 24 h infiziert. Die zu den angegebenen Zeitpunkten genommenen Überstände wurden mittels Plaque Assay auf die enthaltene Anzahl infektiöser Einheiten getestet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. (Abbildung: Jessica von Recum, RKI)



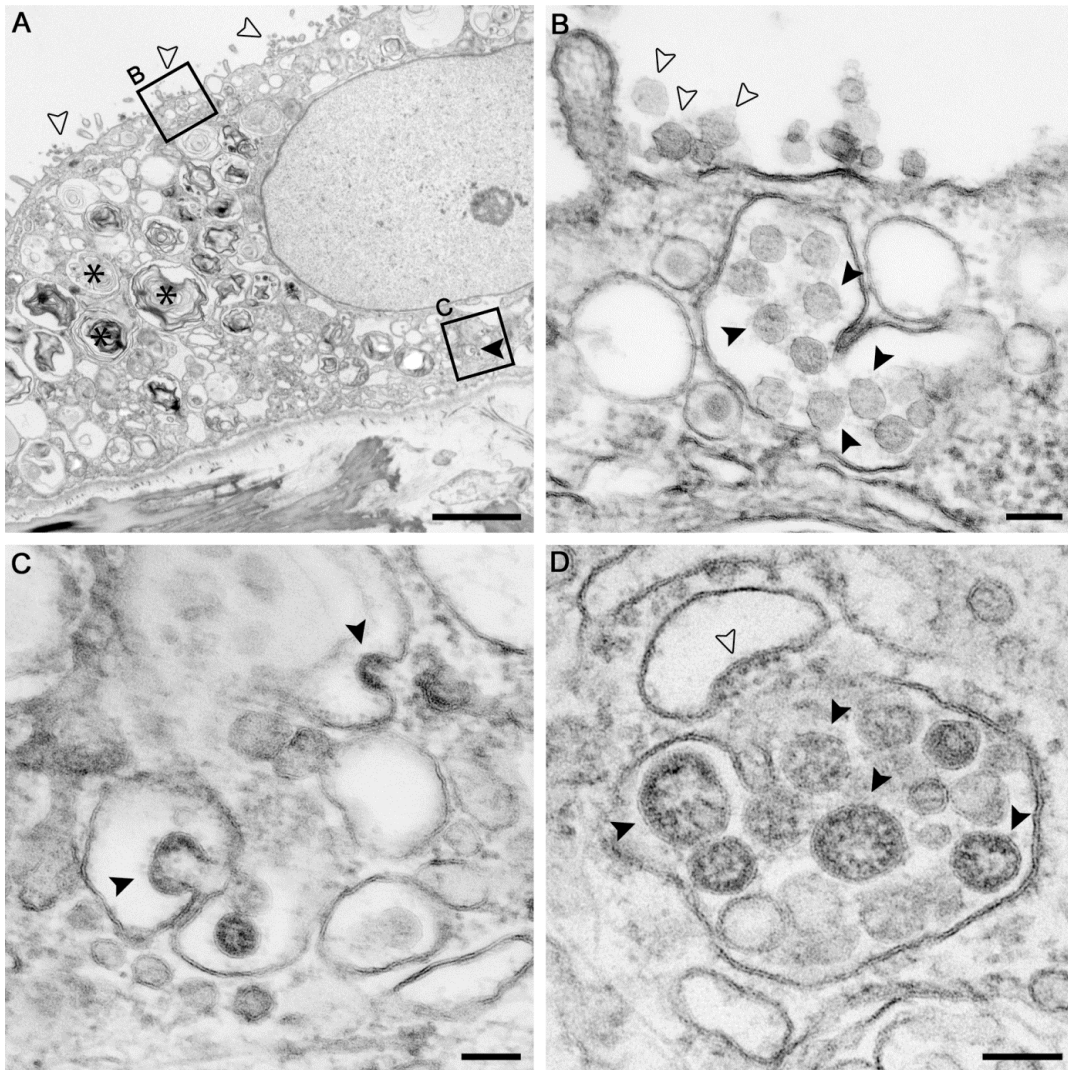
Anhang 2: Replikation des MERS-CoV in *ex vivo* infiziertem humanem Lungengewebe.

Humane Lungengewebeproben wurden mit 1×10^5 (MERS-CoV) oder 4×10^5 pfu (Thai/04(H5N1)) infiziert. Die zu den angegebenen Zeitpunkten genommenen Überstände wurden mittels Plaque Assay auf MDCK Zellen (Thai/04(H5N1)) oder Vero-Zellen (MERS-CoV) titriert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. (Abbildung: Jessica von Recum, RKI)



Anhang 3: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) MERS-CoV infizierter Typ I Zellen.

Humanes Lungengewebe wurde für 24 h mit MERS-CoV infiziert und für die TEM aufbereitet. **(A)** Detektion intravesikulärer Viruspartikel (schwarze Pfeilspitze) in Typ I Zelle, welche durch das Vorhandensein zahlreicher Caveolae (offene Pfeilspitze) im Zytoplasma charakterisiert ist. Alveolarraum (Sternchen), Basallamina (BL), Endothelzelle (EN). Maßstab 1 μm . **(B)** Vergrößerung der Region B in (A) zeigt drei Viruspartikel in separaten Vesikeln (schwarze Pfeilspitze). Ein Vesikel zeigt die frühe Abschnürungsphase eines zweiten Viruspartikels in das Vesikel (Pfeil). **(C)** Typ I Zelle mit Viruspartikel auf der Zelloberfläche (offene Pfeilspitze) und zwei Virionen in separaten Vesikeln (schwarze Pfeilspitze). **(D)** Die Basallamina (BL) zwischen einer Typ I Zelle (offene Pfeilspitze) und einer Endothelzelle (EN) zeigt drei Viruspartikel (schwarze Pfeilspitze). Maßstab in (B), (C) und (D) 100 nm. (Abbildung: Michael Laue, RKI)



Anhang 4: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) MERS-CoV infizierter Typ II Zellen.

Humanes Lungengewebe wurde für 24 h mit MERS-CoV infiziert und für die TEM aufbereitet. **(A)** Detektion von sich intravesikulär abschnürenden Viruspartikeln (schwarze Pfeilspitze) und die Freisetzung der Viruspartikel von der Zelloberfläche einer Typ II Zelle (offene Pfeilspitze), welche durch das Vorhandensein von Lamellar bodies (Sternchen) identifiziert werden kann. Maßstab 2 μ m. **(B)** Vergrößerung der Region B in (A) zeigt Viruspartikel auf der Zelloberfläche (offene Pfeilspitze) und Viruspartikel in großen Vesikeln unter der apikalen Membran (schwarze Pfeilspitze). **(C)** Vergrößerung der Region C in (A) zeigt sich intravesikulär abschnürende Virionen (schwarze Pfeilspitze). **(D)** Großes Vesikel in Typ II Zelle mit Viruspartikeln (schwarze Pfeilspitze). Leeres Vesikel zeigt die frühe Abschnürungsphase eines Viruspartikels (offene Pfeilspitze). Maßstab in (B), (C) und (D) 100 nm. (Abbildung: Michael Laue, RKI)

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt publiziert:

Weinheimer VK*, Becher A*, Tonnies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Szymanski K, Temmesfeld-Wollbrueck B, Gruber AD, Bannert N, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T, Hocke AC: **Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung**, *J Infect Dis* 2012, 206:1685-1694

Hocke AC*, Becher A*, Knepper J, Peter A, Holland G, Tonnies M, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Muth D, Wendtner CM, Rückert JC, Drosten C, Gruber AD, Laue M, Suttorp N, Hippenstiel S[#], Wolff T[#]: **Emerging human middle East respiratory syndrome coronavirus causes widespread infection and alveolar damage in human lungs**, *Am J Respir Crit Care Med* 2013, 188:882-886

Hocke AC, Berg J, Becher A, Knepper J, Klauschen F, Tonnies M, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Gruber AD, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T: **Reply to Fujino et al**, *J Infect Dis* 2013, 207:693-695

Knepper J*, Schierhorn KL*, Becher A, Budt M, Tonnies M, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Gruber AD, Suttorp N, Schweiger B, Hippenstiel S, Hocke AC, Wolff T: **The novel human influenza A(H7N9) virus is naturally adapted to efficient growth in human lung tissue**, *MBio* 2013, 4:e00601-00613

*,[#] contributed equally

Von dieser Arbeit unabhängige Veröffentlichungen:

Szymanski KV, Toennies M, Becher A, Fatykhova D, N'Guessan PD, Gutbier B, Klauschen F, Neuschaefer-Rube F, Schneider P, Rückert J, Neudecker J, Bauer TT, Dalhoff K, Dromann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC: **Streptococcus pneumoniae-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue**, *Eur Respir J* 2012, 40:1458-1467

Vorträge

DGP 17.-20. März 2010, Hannover

„Differentielles Infektionsverhalten human-pathogener, porciner und aviärer Influenza A Viren in humanen Lungen“, A. Becher, V. Weinheimer, A. Hocke, K. Szymanski, K. Dalhoff, D. Drömann, T. Bauer, M. Tönnies, N. Suttorp, T. Wolff, S. Hippenstiel

KIT (Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin) 23.-26. Juni 2010, Köln

„Infektionsverhalten human-pathogener, porciner und aviärer Influenza A-Viren in humanen Lungen“, A. Becher, V. Weinheimer, A. Hocke, K. Szymanski, K. Dalhoff, D. Drömann, T. Bauer, M. Tönnies, N. Suttorp, T. Wolff, S. Hippenstiel

DGP 07.-10. April 2011, Dresden

„Infektionsverhalten saisonaler, hoch-pathogener H5N1 und pandemischer H1N1 Influenza A Viren in humanen Lungen“, A. Becher, V. Weinheimer, A. Hocke, K. Szymanski, K. Dalhoff, D. Drömann, T. Bauer, M. Tönnies, N. Suttorp, T. Wolff, S. Hippenstiel

DGP, Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie, 12.-13. November 2010, Berlin

„Infektionsverhalten saisonaler, hoch-pathogener H5N1 und pandemischer H1N1 Influenza A Viren in humanen Lungen“, A. Becher, V. Weinheimer, A. Hocke, K. Szymanski, K. Dalhoff, D. Drömann, T. Bauer, M. Tönnies, N. Suttorp, T. Wolff, S. Hippenstiel

KIT (Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin) 25.-28. Juni 2014, Köln

„Emerging Infections im humanen Lungenorganmodell (MERS-CoV, H7N9)“, A. Becher, J. Knepper, K. L. Schierhorn, A. Hocke, T. Bauer, M. Tönnies, J. Neudecker, J. C. Rückert, C. Drosten, A. D. Gruber, N. Suttorp, T. Wolff, S. Hippenstiel

Poster

Flu Research Net Meeting, 12.-14. September 2010, Münster

“Cell tropism of pandemic H1N1 and H5N1 influenza A viruses in a human lung explant model“, A. Becher, A. C. Hocke, V. K. Weinheimer, T. Bauer, M. Tönnies, T. Wolff, S. Hippenstiel

Flu Research Net Meeting, 2.-4. September 2012, Münster

“Induction of Apoptosis by Seasonal and Highly Pathogenic IAV in *ex vivo* infected Human Lung Tissue“, A. Becher, V.K. Weinheimer, T. Bauer, M. Tönnies, A. D. Gruber, T. Wolff, N. Suttorp, S. Hippenstiel, A. Hocke

Preise

CAPNETZ-AWARD 2013 für die Forschungsarbeit **“Emerging human middle East respiratory syndrome coronavirus causes widespread infection and alveolar damage in human lungs.”** in der Fachzeitschrift AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, verliehen auf der DGP 2014 in Bremen

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Suttorp für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie an der Charité anzufertigen.

Prof. Stefan Hippenstiel und Dr. Andreas Hocke danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die exzellente Betreuung während der Promotion. Darüber hinaus bin ich auch dankbar für die intensive Betreuung meines Promotionsprojekts im Rahmen unserer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Thorsten Wolff am RKI, Berlin.

Weiterhin möchte ich mich bei den Thoraxchirurgen Dr. Mario Tönnies vom HELIOS Klinikum Emil von Behring, PD Dr. Paul Schneider von den DRK Kliniken Berlin Mitte und PD Dr. Jens Rückert sowie PD Dr. Jens Neudecker aus der Charité Campus Mitte für die kontinuierliche Bereitstellung von humanem Lungengewebe bedanken.

Weiterer Dank geht an Dr. Frederick Klauschen vom Institut für Pathologie an der Charité Campus Mitte für die Diagnostik histologischer Gewebeproben.

Bei allen Kollegen des Labors bedanke ich mich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre, welche ich insbesondere in schwierigen Zeiten zu schätzen wusste.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie für die fortlaufende Unterstützung während der Promotion bedanken.